

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA**

**EFEECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO  
DE LAS HOJAS DE *Peumus boldus* “Boldo” EN LA  
TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR  
RIFAMPICINA EN RATAS HOLTZMAN HEMBRA**

**TESIS**

**Para optar por el Título Profesional de Médico Cirujano**

**AUTOR**

**Jorge Luis Olivares Huamán**

**ASESOR**

**José Ernesto Ráez González**

**Lima – Perú**

**2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Ernesto Ráez Gonzales y a la Mg. Nancy Joaquina Rojas Morán, quienes brindaron su apoyo constante para el desarrollo de la Tesis.

Al personal de la Escuela Académico Profesional de Medicina Humana, quienes nos han guiado a través del proceso de la obtención del título profesional.

A la Dr. Flor Cruz y los señores Rosauero y Sonco, quienes ayudaron paso a paso a la realización de esta Tesis.

Jorge Luis Olivares Huamán

## **DEDICATORIA**

A Dios.

A mi padre, Jaime Orso Olivares Flores, y mi madre, Victora Huamán Chuquizuta,  
por su esfuerzo, apoyo incondicional y por creer en mí.

Jorge Luis Olivares Huaman

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
CAPITULO I:	11
1.1 Planteamiento del problema	
1.2 Formulación de objetivos	
1.3 Justificación del estudio	
1.4 Limitaciones del estudio	
CAPITULO II	23
2.1 Marco teórico	
2.2 Formulación de hipótesis	
CAPITULO III:    Diseño metodológico	40
3.1 Tipo de investigación	
3.2 Población y muestra de estudio	
3.3 Variables	
3.4 Procedimientos y análisis de datos	
3.5 Consideraciones éticas	
CAPITULO IV:	
4.1 Resultados	49
4.2 Discusiones	
CAPITULO V:	82
5.1 Conclusiones	
5.2 Recomendaciones	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	90

## INDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Esquema de protocolo de experimentación.	44
<b>Cuadro 2.</b> Escala de valoración histopatológica de daño hepático.	46
<b>Cuadro 3.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en el peso de los animales en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	50
<b>Cuadro 4.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de bilirrubina total en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas	51
<b>Cuadro 5.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de bilirrubina directa en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	52
<b>Cuadro 6.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de bilirrubina indirecta en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	53
<b>Cuadro 7.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de proteínas totales en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	54
<b>Cuadro 8.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de albúmina en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	55
<b>Cuadro 9.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de globulina en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	56
<b>Cuadro 10.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de TGO en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.	57
<b>Cuadro 11.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>Peumus boldus</i> en los niveles séricos de TGP en la toxicidad hepática	58

inducida por rifampicina en ratas.

**Cuadro 12.** Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el peso de los hígados en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas. 61

**Cuadro 13.** Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el largo de los hígados en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas. 62

**Cuadro 14.** Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el ancho de los hígados en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas. 63

**Cuadro 15.** Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en la morfología hepática en la toxicidad inducida por rifampicina en ratas. 73

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Hojas de <i>Peumus boldus</i> .	23
<b>Figura 2.</b> Boldina (Principio activo de <i>Peumus boldus</i> ).	24
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de toxicidad por antituberculosos	35
<b>Figura 4.</b> Valores normales de enzimas hepáticas en ratas.	38
<b>Figura 5.</b> Fórmula para el cálculo del tamaño muestral.	40
<b>Figura 6.</b> Comparación de pesos iniciales , finales y variación de peso entre grupos experimentales	50
<b>Figura 7.</b> Aspectos macroscópicos de los hígados en los grupos experimentales.	60
<b>Figura 8.</b> Comparación de promedios de peso, largo y ancho de los hígados entre los grupos experimentales.	63
<b>Figura 9.</b> Cambios histopatológicos del tejido hepático en los grupos de experimentación.	65
<b>Figura 10.</b> Comparación de cambios histopatológicos entre los grupos experimentales	72

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio experimental completo. Se adquirieron 24 ratas Holtzman hembra, y fueron divididas, aleatoriamente, en 4 grupos: A (control), B (rifampicina 100 mg/kg), C (silimarina 200 mg/kg y rifampicina 100 mg/kg) y D (boldo 160 mg/kg y rifampicina 100 mg/kg). Dicho protocolo se realizó por 14 días. Se analizaron variables clínica, bioquímicas (se realizó perfil hepático antes y después del experimento) y morfológica. Se compararon las medias de los grupos mediante la prueba de Kruskal Wallis y se consideró significativo  $p < 0,05$ . **Resultados:** Al finalizar el experimento, las ratas del grupo B perdieron más peso (16,41  $\pm$  17,94 gr), tuvieron mayor elevación de bilirrubinas totales (0,25  $\pm$  0,13), bilirrubina directa (0,21  $\pm$  0,12), TGP (48,83  $\pm$  17,72) y sus hígados fueron más congestivos, pesaron y midieron más. Las proteínas totales (0,66  $\pm$  0,38) y albúmina (0,33  $\pm$  0,35) del grupo B fueron menores comparado con los grupos C y D. No se halló diferencia significativa en cuanto a la bilirrubina indirecta, globulina y TGO. Los hígados del grupo B mostraron mayores cambios histopatológicos (5,33  $\pm$  0,51) en comparación con los demás grupos. **Conclusiones:** el extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* posee efecto protector en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

**Palabras claves:** hepatotoxicidad, rifampicina, boldo



## ABSTRACT

**Objective:** To determinate the protective effect the aqueous extract of the leaves of *Peumus boldus* “Boldo” on rifampicin-induced liver toxicity in female Holtzman rats. **Materials and methods:** A complete experimental study was conducted. 24 female Holtzman rats were used. They were divided in 4 groups: A (control), B (rifampicin 100 mg/kg), grupo C (silimarina 200 mg/kg and rifampicin 100 mg/kg) y D (boldo 160 mg/kg and rifampicin 100 mg/kg). Rifampicin was administrated one hour after treatment in groups C and D. This protocol was carried out for 14 days. Clinical, biochemical (liver function test were performed before and after the experiment) and morphological variables were analyzed. Means were compared using the Kruskal Wallis test and results were considered significant when  $p < 0,05$ . **Results:** At the end of the experiment, rats from group B were the ones who lost more weight, (16,41  $\pm$  17,94 gr), showed grater elevation of total bilirubin (0,25 $\pm$ 0,13), direct bilirubin (0,21  $\pm$  0,12), TGP (48,83  $\pm$  17,72), and whose livers were found to be more congestive, were bigger and weighed more. Whereas leves of total proteins (0,66  $\pm$  0,38) and albumin (0,33  $\pm$  0,35) in grupo B were lower than in other groups. No significant difference was found in levels of indirect bilirrubina, globulin and TGO. More intense morphological changes were found in livers froms group B (5,33  $\pm$  0,51) compared with other groups. **Conclusions:** After analyzing clinical, biochemical and morphological parameter, it can be concluded that the aqueous extract of leaves of *Peumus boldus* has protective effect on rifampicin-induced liver toxicity in female Holtzman rats.

**Key words:** hepatotoxicity, rifampicin, boldo.

## INTRODUCCION

El 80% de la población mundial utiliza productos naturales como parte de la medicina tradicional, dentro de ellos el *Peumus boldus* “boldo”. Éste es un árbol que crece en el sur del Perú y es utilizado de manera tradicional como hepatoprotector. En él se han identificado, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la presencia de compuestos activos como flavonoides y alcaloides. Dentro de ellos, la boldina es la más abundante y a la que se le atribuyen sus propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras.

Por otro lado, la infección por el *Mycobacterium tuberculosis* es una enfermedad endémica en el Perú y el mundo. Reportándose, en el 2013, 9 millones de tratamientos administrados y mortalidad anual de 1.5 millones.

La terapia antituberculosa requiere, debido a las características especiales del patógeno, de la combinación y el uso prolongado de diversos fármacos potencialmente hepatotóxicos como la rifampicina. Siendo la incidencia de toxicidad hepática inducida por éstos fármacos variable en la literatura (4,3 % a 19%).

La rifampicina es un fármaco antituberculoso de primera línea derivado de las rifamicinas. Se reconoce que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en su hepatotoxicidad, llevando a la peroxidación lipídica y daño de membranas. Es por ello que se postula que los productos naturales con capacidades antioxidantes, como el *Peumus boldus*, podrían reducir e incluso revertir el daño hepático inducido por rifampicina.

Por lo que éste estudio se propuso determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

## CAPITULO I:

### 1.1 Planteamiento del problema

#### 1.1.1 Descripción del Problema

En la medicina tradicional, diversos productos naturales se emplean para el tratamiento de enfermedades hepáticas, dentro de ellos el *Peumus boldus* “boldo”. Se ha incrementado la busca de posibles hepatoprotectores debido a las grandes cantidades de toxinas al cual el tejido hepático se encuentra expuesto. <sup>1</sup>

El Boldo es un árbol que crece en el sur del Perú, Chile y Argentina; y posee diversos compuestos activos, identificados mediante la utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Dentro de ellos, se hallan alcaloides, flavonoides y aceites esenciales, siendo la boldina la más abundante y a la que se le atribuyen propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras. <sup>2</sup>

El efecto hepatoprotector se refiere a la regeneración de células hepáticas mediante la estimulación de la función natural del hígado de reemplazar células dañadas. Asimismo, el boldo es capaz de estimular los sistemas de detoxificación del hígado, siendo uno de los más importantes los sistemas enzimáticos de catalasas y superóxido desmutasa. <sup>2</sup>

Por otra parte, la tuberculosis es una enfermedad endémica a nivel mundial y nacional; y tiene graves repercusiones a mediano y largo plazo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que durante el 2013 se diagnosticaron 9 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1.5 millones de personas fallecieron por esta causa.<sup>3</sup>

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* es una enfermedad especial dado que el patógeno posee características particulares como ser de crecimiento lento, pared celular resistente, localización tanto extra como intracelular, poseer múltiples mecanismos de resistencia y aparición continua de cepas multidrogoresistentes, por lo que siempre requiere un tratamiento combinado y prolongado que debe incluir principalmente isoniazida y rifampicina por un plazo dependiente del tipo de tuberculosis y sensibilidad a los fármacos antituberculosos.<sup>4</sup>

Los antituberculosos poseen posibles efectos adversos como hepatotoxicidad, reacciones de la piel, alteraciones gastrointestinales y neurológicas. Dentro de éstas, la toxicidad hepática es la que se considera de mayor gravedad debido a su elevada tasa de morbilidad y mortalidad; y debido a que interfiere con el éxito del tratamiento y contribuye al riesgo de recaída, a la no adherencia al tratamiento y producción de cepas multidrogoresistente.<sup>5</sup> Asimismo, la toxicidad hepática inducida por antituberculosos es el efecto adverso que más frecuentemente lleva a la suspensión de la terapia.<sup>6</sup>

Según reportes internacionales, la toxicidad hepática producida por antituberculosos fluctúa entre 4,3% y 19% en adultos y es de 0,8% en niños. Siendo la incidencia en monoterapia con isoniazida del 0,5% y durante el tratamiento con rifampicina del 2%.<sup>4</sup>

Particularmente, la rifampicina es un fármaco antituberculoso de primera línea derivado de las rifamicinas que puede causar daño

hepático por sí solo en humanos, ratas, ratones y conejos. Éste produce estrés oxidativo que causa la peroxidación lipídica de la membrana celular y daña el hepatocito, siendo a su vez un fármaco potenciador de la toxicidad hepática inducida por otros fármacos como la isoniazida, mediante la inducción del citocromo P450 (CYP450).<sup>7</sup>

En la mayoría de los casos, no existe un tratamiento efectivo para la toxicidad hepática producida por fármacos, a excepción de la inducida por paracetamol y valproato donde hay evidencia que apoya la utilización de N-acetilcisteína y carnitina, respectivamente.<sup>6</sup> Por lo que diversos autores han propuesto distintos productos como posibles protectores de la injuria hepática por antituberculosos (ajo, silimarina n-acetilcisteína) debido a su capacidad antioxidante y a que no interfieren con las acciones terapéuticas de los fármacos. Siendo los principales mecanismos implicados en el efecto hepatoprotector de estos productos naturales, la inhibición del citocromo P450 2E1 (CYP450 2E1) y su acción antioxidante y estabilizadora de membrana.<sup>8,9</sup>

Debido a que una de las principales vías de injuria hepática inducida por rifampicina es el estrés oxidativo, los productos antioxidantes, como el *Peumus boldus*, podrían en teoría prevenir la injuria hepática y potenciar la regeneración de los tejidos dañados.

Por lo que este estudio se propone determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

En este estudio se utilizarán ratas de la cepa Holtzman (*Rattus norvegicus*) debido a que se ha demostrado su mayor susceptibilidad a reacciones mediadas por el sistema inmune a diferencia de otras

cepas y que dichas reacciones inmunológicas parecerían encontrarse implicadas en mecanismos patogénicos de las reacciones de idiosincrasia que se evidencian en la toxicidad hepática inducida por fármacos antituberculosis.<sup>9, 10</sup>

### **1.1.2 Antecedentes**

El efecto protector del extracto acuoso de Boldo ha sido estudiado por Ochoa *et. al.*, en la toxicidad hepática inducida por paracetamol. En este estudio se utilizaron 30 ratas Holtzman macho que fueron divididos en 5 grupos, grupo control, grupo blanco y 3 grupos experimentales que recibieron el extracto acuoso de boldo a concentraciones de 80 mg/kg, 120 mg/g y 160 mg/g. Hallándose que los niveles finales de transaminasa hepática fueron menores en los grupos experimentales que recibieron extracto acuoso de boldo, comparados con el grupo que recibió sólo paracetamol. En la histopatología, los grupos que recibieron Boldo mostraron arquitectura hepatocelular conservada, dosis dependiente. Este estudio concluye que el tratamiento con extracto acuoso de boldo a dosis de 160 mg/kg posee mayor efecto protector comparado con los grupos que recibieron 120 mg/kg y 80 mg/kg.<sup>10</sup>

Veloz D. realizó también un estudio acerca del efecto protector del extracto acuoso de Boldo en la toxicidad hepática por paracetamol. En dicho estudio demostró la presencia en el extracto de boldo, mediante el tamizaje fitoquímico, de compuestos lactónicos, azúcares, quinonas, saponinas, y metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y triterpenos, los cuales le confieren actividad hepatoprotectora y antioxidante. El efecto protector en la injuria hepática inducida por paracetamol fue dosis dependiente, evidenciándose una elevación mayor de las

transaminasas con el extracto acuoso de Boldo a una concentración del 33% (85,7%), comparado con concentraciones del 66% (46%) y 100% (0.7%). De manera semejante la lesión hepática encontrada en el grupo que recibió el extracto acuoso al 100% (lesión hepática del 10%) fue menor a los grupos que recibieron los extractos acuosos al 66% y 33% (lesión hepática del 50% y 85%, respectivamente) <sup>11</sup>

Por su parte, la silimarina ha sido ampliamente estudiada como hepatoprotectora en diversos modelos animales. Es así que en el estudio realizado por M Singh *et. al.*, se halló reversión significativa del daño hepático en los grupos a los que se les aplicó silimarina. Estos resultados se atribuyen a: 1) reversión del daño a la membrana celular observado en el microscopio de fase de contraste, 2) supresión del daño mitocondrial observado el microscopio confocal y 3) disminución en la apoptosis determinada mediante citometría de flujo. Además la silimarina logra revertir alteraciones morfológicas en los cultivos de células hepáticas y protege contra las lesiones por isquemia/reperfusión al prevenir el deterioro de la función mitocondrial. Por último, los resultados de este estudio corroboran que la silimarina inhibe diversas isoformas del citocromo P450 (CYP450), potencia la capacidad antioxidante del hígado e inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias. <sup>9</sup>

Otros estudios han evidenciado la toxicidad hepática inducida por isoniazida y rifampicina en modelos animales y los efectos benéficos de algunos productos naturales y sintéticos como la cimetidina (Kalra BS *et. a.*)<sup>12</sup>, el kaemferol (Shih TY *et. al.*)<sup>13</sup>, tocoferol (Tayal V *et. al.*)<sup>14</sup>, las hojas de *Carica papaya* ( Pandit A. *et. al.*)<sup>15</sup>, *Spirulina máxima* (Santosh Kumar *et. al.*) <sup>16</sup>, y otros.

### **1.1.3 Formulación del problema**

¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra?

## **1.2 Formulación de objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general:**

- Determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas *Peumus Boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

### **1.2.2 Objetivos específicos:**

- Determinar la alteración en el parámetro clínico producida por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.
- Determinar la alteración en los parámetros bioquímicos producida por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas *Peumus boldus* “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.



- Determinar los cambios macroscópicos en la morfología hepática producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.
- Determinar los cambios histopatológicos producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas *Peumus boldus* "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

### **1.3 Justificación del estudio**

#### **1.3.1 Justificación legal**

Este proyecto de tesis se rige por las Normas para la Elaboración de Tesis para optar el Título Profesional en las Escuelas Académico Profesionales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aprobado mediante la Resolución de Decanato N° 1242-FM-1996 de fecha 27 de julio de 1996, ratificada con Resolución Rectoral N° 5293-CR-1996 de fecha 23 de agosto de 1996.

#### ***Aspectos éticos:***

Para la realización de este estudio se utilizaron el menor número posible de animales necesarios, los tratamientos y la obtención de muestras de sanguíneas se obtuvieron con la ayuda y supervisión de un médico veterinario experto del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de

Salud del Niño y personal experto del Departamento de Fisiología de la UNMSM, para disminuir la posibilidad de daño hacia estos animales.

Asimismo esta investigación seguirá las leyes y principios éticos establecidos por Consejo Internacional de Organizaciones Médicas (CIOM- OMS 1985) para la Investigación Biomédica con Animales.

### ***Factibilidad y viabilidad***

Este estudio es factible, en primer lugar debido al apoyo e interés de algunos de los profesionales del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En segundo lugar, este trabajo de investigación es también viable debido a la disponibilidad de recursos humanos y materiales necesarios para el cumplimiento de los objetivos planteados.

### **1.3.2 Justificación teórico científica**

#### ***Pertinencia***

El Boldo (*Peumus boldus*) es un árbol endémico que crece en el sur del Perú y en los Andes de Chile y Argentina; cuyas hojas son ampliamente utilizadas como hepatoprotector de manera tradicional. Mediante la utilización de cromatografía líquida de alto rendimiento se han identificado diversos compuestos potencialmente antioxidantes en el extracto acuoso de *Peumus boldus*, entre ellos flavonoides y alcaloides, siendo el más abundante la boldina.<sup>11</sup>

La boldina previene la injuria de diversos sistemas biológicos por vías enzimáticas y no enzimáticas, logrando inhibir, in vitro, el inicio y la propagación del daño peroxidativo de membradas iniciado por radicales libres. Por lo que se afirma que éste alcaloide posee potentes efectos antioxidantes. Éstos se han descrito que se encontrarían también implicados en la toxicidad hepática por rifampicina. Por lo que la daño hepático producido por la administración de rifampicina podría evitarse por las propiedades antioxidantes de la boldina.<sup>17</sup>

Asimismo, estudios recientes corroboran el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* en la toxicidad hepática inducida por acetaminofén<sup>10,11</sup>, sin embargo, no existen estudios acerca del posible efecto protector del Boldo (*Peumus boldus*) en la toxicidad hepática inducida por rifampicina.

Por su parte, la tuberculosis es un grave problema de salud pública. Reportando la OMS en el año 2013, 9 millones de casos nuevos y 1.5 millones de personas fallecidas debido a ésta causa<sup>3</sup>. Por lo que este estudio tiene repercusión en una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial.

La infección por el *Mycobacterium tuberculosis* tiene particularidades debido a que el patógeno posee una pared celular resistente, es de localización intra y extracelular, de crecimiento lento y posee la capacidad de producir cepas multidrogoresistentes. Por esta razón, para el tratamiento de ésta es obligada la combinación de diversos fármacos, principalmente isoniazida y rifampicina, incrementando el riesgo de toxicidad hepática producida por estos medicamentos. Ésta contribuye a la interrupción de la terapia antituberculosa, a la no adherencia al tratamiento, a la falla del tratamiento y por último a la producción de cepas multidrogoresistentes.<sup>4</sup> Por lo que sería recomendable la administración conjunta de fármacos hepatoprotectores en la terapia contra la tuberculosis para evitar las posibles consecuencias ya mencionadas.

Debido a que el estrés oxidativo constituye el principal mecanismo de producción de injuria hepática inducida por rifampicina, cabe pensar que los productos antioxidantes, *Peumus boldus*, podrían reducir la injuria hepática o incluso tener capacidad regenerativa del tejido hepático.<sup>18</sup>

Finalmente, el Boldo se encuentra al alcance de la población general, especialmente aquella afectada por la tuberculosis, debido a su bajo costo, en comparación con los productos cuyo efecto hepatoprotector ya ha sido ampliamente demostrado como la silimarina. Es por ello que este estudio se propone aportar mayor conocimiento científico

acerca de un producto natural accesible a todos los estratos de la población peruana.

### ***Ausencia de duplicación***

El boldo se utiliza de manera tradicional como hepatoprotector. Sin embargo, no existen muchos estudios acerca de sus efectos benéficos, a excepción de su efecto protector en la toxicidad inducida por acetaminofén. Por lo que según la revisión bibliográfica no existen estudios similares.

### ***2.3.3 Justificación práctica***

Este estudio servirá como aporte científico para sustentar y recomendar el uso rutinario del extracto acuoso de hojas de Boldo como hepatoprotector en pacientes que se encuentran en terapia antituberculosa, con el fin de disminuir el riesgo de interrupción de la terapia, falla y no adherencia a ésta y por ende la producción de cepas multidrogoresistentes de *M. tuberculosis*.

Finalmente, este estudio pretende incentivar las investigaciones con productos naturales de nuestro país y la realización de futuros estudios experimentales que no posean las limitaciones encontradas en éste proyecto de Tesis.

## **1.4 Limitaciones del estudio**

Se recomienda que en futuros estudios experimentales similares se realicen análisis bioquímicos de medición de oxidación en tejidos

hepáticos como la medición de catalasa, glutatión oxidasa y superóxido desmutasa.

Asimismo se recomienda el análisis bioquímico de otros marcadores de toxicidad hepática que no se realizarán en este estudio como tiempo de protrombina, INR (international normalized ratio), fosfatasa alcalina y deshidrogenasa láctica.

## CAPITULO II

### 2.1 Marco teórico

#### **Boldo (*Peumus boldus*)<sup>11</sup>**

El Boldo es un árbol de la familia Monimiácea y es endémico en la sierra sur de Perú, Argentina y centro de Chile. Puede alcanzar alturas mayores de 15 metros, es de crecimiento lento y posee hojas ovoides de 3 a 7cm de longitud. Posee flores blanquecinas de 7 pétalos y son unisexuadas (dioico), por lo que cada árbol posee flores de un solo sexo. Lo que hace necesaria la proximidad de arboles masculinos y femeninos para que se lleve a cabo la polinización. Posee además frutos de pequeño tamaño, color verde y sabor dulce.

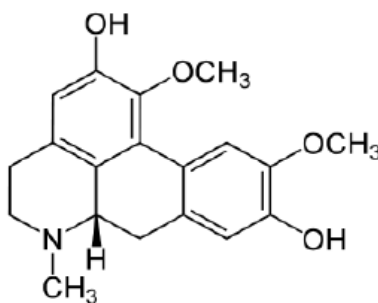


*Figura 1. Hojas de **Peumus boldus**. Fuente. Tomado de Veloz D. (2013).<sup>11</sup>*

Esta planta posee dentro de sus principios activos 20 alcaloides, aceites esenciales, flavonoides y taninos. Éstos le confieren propiedades digestivas y hepatoprotectoras. Dentro de ellos destaca

el alcaloide boldina, abundante también en la corteza del arbusto, el cual estimula la secreción biliar y producción de jugos gástrico.

Los flavonoides son reconocidos por disminuir el riesgo de enfermedades cardiacas; los taninos por sus propiedades antioxidantes y los aceites esenciales (como eucaliptol y ascaridiol) por sus propiedades desinflamatorias.



**Figura 2. Boldina (Principio activo de *Peumus boldus*).** Fuente. Tomado de Veloz D.<sup>11</sup>

Se ha identificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) a la boldina, la cual se encuentra ampliamente en las hojas y corteza de de *Peumus boldus*.<sup>19</sup>

Este compuesto posee propiedades hepatoprotectoras, colagogas, antiespasmódicas, sedativas, antioxidantes, reguladoras de la función hepática, antimicrobianas sobre patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* (Schrickel *et al.*, 2001)<sup>19</sup> y antitripanosomales (*Trypanosoma brucei brucei*) y citotóxicas (sobre células HeLa en cultivos in vitro).<sup>17</sup>

Se ha demostrado también que la boldina es capaz de disminuir la toxicidad hacia los sistemas biológicos producida por los radicales



libres, mediante la reducción de la peroxidación lipídica de membranas celulares utilizando vías enzimáticas y no enzimáticas.<sup>17</sup>

La planta que se utilizará en este estudio ha sido identificada por el Biólogo. Severo Baldeón del Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y ha sido clasificada taxonómicamente como sigue:

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: MAGNOLIDIAE**

**ORDEN: LAURALES**

**FAMILIA: MIONIMIACEAE**

**GÉNERO : *Peumus***

**ESPECIE: *Peumus boldus* Molina**

### ***Toxicidad hepática***

La toxicidad hepática medicamentosa se define como el daño producido por un xenobiótico al hígado, alterando su función. La importancia de reconocer este cuadro radica en su potencial morbimortalidad, pudiendo en algunos casos llegar a una hepatitis fulminante; constituyendo este efecto adverso la primera causa de retiro de medicamentos del mercado por parte de la industria farmacéutica.<sup>4</sup>

La toxicidad hepática inducida por antituberculosos puede determinarse de acuerdo a los criterios establecidos por el Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) y la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas. Dichos criterios son como siguen: <sup>4,20,21.</sup>

- Elevación de las transaminasas más de tres veces por encima de su límite superior normal y dos veces en el caso de la fosfatasa alcalina, no asociado a síntomas
- Elevación más de tres veces el límite superior normal de las transaminasas, asociado a síntomas
- Elevación mayor de cinco veces el límite superior normal de las transaminasas con o sin síntomas
- Incremento de las bilirrubinas más de dos veces el valor normal.

Sin embargo, la definición de toxicidad hepática medicamentosa puede variar de acuerdo a la entidad, o a la literatura revisada.

La (OMS) clasifica la intensidad de la hepatitis en: leve (alanina aminotransferasa <2.5 veces el límite superior normal), media (alanina aminotransferasa 2.6 -5.0 veces el límite superior normal), moderada (alanina aminotransferasa 5-10 veces el límite superior normal) y severa (mayor de 10 veces el límite superior normal). <sup>22</sup>

### ***Aspectos epidemiológicos***

La toxicidad hepática inducida por medicamentos representa el 7% de los casos reacciones adversas, el 2% de los síndromes ictericos

en hospitales y aproximadamente el 30% de los casos de hepatitis fulminante, a nivel mundial. También es, en la actualidad, la causa más frecuente de falla hepática aguda, sobrepasando a la hepatitis viral.<sup>23</sup>

La incidencia de toxicidad hepática producida específicamente por antituberculosos fluctúa entre 4.3% y 19%, siendo la incidencia en la población infantil de 0.8%. Se reporta una incidencia de 2% en pacientes en tratamiento con rifampicina, en monoterapia.<sup>4</sup>

La toxicidad hepática inducida por antituberculosos es más frecuente en países en vía de desarrollo (8-10%) comparada con países desarrollados (2-3 %) <sup>15</sup> Ello podría deberse a la mayor incidencia de malnutrición, baja de peso durante el tratamiento, coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a las enfermedades asociadas en los pacientes que viven en países en vía de desarrollo en comparación con países desarrollados. En el estudio realizado por Ali AH. *et. al* se concluyó que la malnutrición (índice de masa corporal menor a 18.5 kg/m<sup>2</sup>) es un factor de riesgo asociado a la toxicidad hepática producida por antituberculosos . Ello podría deberse a un estado de depleción de las reservas de glutatión presente en estados de malnutrición, lo cual resultaría en una mayor vulnerabilidad a las injurias por oxidantes. Este estudio también demostró que la coinfección con VIH y la presencia de tuberculosis pulmonar diseminada son factores de riesgo asociados al desarrollo de toxicidad hepática producida por antituberculosos.<sup>25</sup>

Asimismo, la disminución de peso de 2 kg durante el tratamiento antituberculoso resultó un factor de riesgo para la producción de daño hepático en el estudio realizado por Warmelink I. *et. al*.<sup>25</sup>

### ***Mecanismos de biotransformación hepática***<sup>5</sup>

El hígado se halla expuesto a una gran concentración de sustancias exógenas y sus metabolitos y se encarga de maximizar el proceso de absorción de nutrientes y minimizar la exposición del organismo a toxinas y drogas exógenas. Para la eliminación de tóxicos, el hígado debe someterlos a diversas transformaciones químicas con el fin de disminuir su liposolubilidad y excretarlos. Aunque éste proceso de depuración pueden realizarse en casi todos los tejidos del organismo, la localización de elección es el retículo endoplásmico hepático, convirtiéndolo en un lugar muy susceptible a daño por xenobióticos.

Existen tres fases de biotransformación hepática: fase I (reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación), fase II (reacciones de conjugación) y fase III (eliminación de las sustancias del hígado y del organismo).

Durante la fase I ocurren reacciones químicas que preparan al xenobiótico para ingresar a la fase II, las cuales incluyen reacciones de reducción-oxidación, hidrólisis, hidratación y otras menos frecuentes. Durante ésta, se incrementa la hidrosolubilidad de las drogas y pueden generarse metabolitos reactivos.

### ***Mecanismos de toxicidad hepática***

Las drogas exógenas pueden ocasionar daño hepático por diversos mecanismos, lesionando hepatocitos, células epiteliales del tracto biliar o la vasculatura hepática. Asimismo, el daño puede ser producido por el fármaco en su forma primaria, por un metabolito de éste o mediante una respuesta inmunológica.<sup>26</sup>

Existen dos tipos de mecanismo de lesión hepática: predecibles e impredecibles. El primero se caracteriza por producir daño hepático de manera dosis dependiente, tener una tasa de ataque mayor, ocurrir más rápidamente y producir lesiones zonales. Mientras que el segundo se caracteriza por ser reacciones impredecibles o idiosincráticas, las cuales ocurren independientemente de la dosis.<sup>26</sup>

Los mecanismos implicados en el daño hepático de tipo idiosincrático son desconocidos, sin embargo, se acepta que su origen puede estar relacionado con la producción de metabolitos reactivos durante la fase I de biotransformación hepática, cuyas reacciones se encuentran controladas por el citocromo P450 (CYP450).<sup>11</sup> Las enzimas este citocromo conforman una importante superfamilia de hemoproteínas que son responsables de la monooxigenación de diversos xenobióticos. Dentro de sus isoformas, el citocromo P450 2E1 (CYP4502E1) es el responsable de la biotransformación de agentes terapéuticos como la isoniazida, rifampicina y paracetamol. Dichas enzimas se hallan bajo control genético, por lo que su ausencia o polimorfismo, puede determinar la inactivación del compuesto original o la formación de metabolitos aberrantes. Todo ello genera radicales liberados intracelulares y compuestos electrofílicos que se unen covalentemente a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Éstos depleccionan el glutatión celular e inducen peroxidación lipídica, lo cual culmina en muerte celular por necrosis o apoptosis.<sup>27</sup>

Un tercer tipo de mecanismo de lesión hepática propuesto es la formación de un “neoantígeno” a partir de la unión covalente de la droga o su metabolito a proteínas. Lo cual induce respuestas mediadas por anticuerpos, células T y respuestas eosinofílicas (ocasionalmente); y produce la liberación del factor de necrosis

tumoral alfa, la interleukina-2 y interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y promoviendo la muerte celular programada por apoptosis.<sup>26</sup>

### ***Factores de riesgo***

La toxicidad hepática producida por medicamentos es dependiente de factores tanto genéticos como adquiridos, los cuales actúan preferentemente inhibiendo el CYP P450. Dentro de éstos factores se mencionan principalmente los factores genéticos, edad, género, alteraciones metabólicas, factores hormonales, alcoholismo, interacción con otros medicamentos y la presencia de comorbilidades.<sup>27</sup>

La enzima glutathione-S-transferasa (GST) juega un rol importante en la detoxificación de metabolitos durante la fase II de la biotransformación hepática y elimina los radicales liberados intracelulares mediante la unión del glutatión a los metabolitos producidos por el CYP 450 2E1. Por lo que la producción de isoformas de ésta enzima incrementa el riesgo de toxicidad hepática inducida por antituberculosos, lo cual se encontraría genéticamente determinado.<sup>28</sup>

Otro factor probablemente asociado a la presencia de toxicidad hepática inducida por antituberculosos es la coinfección con el VIH, posiblemente debido al uso combinado con fármacos antirretrovirales. Aunque algunos estudios no han corroborado un incremento de la tasa de este efecto adverso en dicha población.<sup>22</sup>

### ***Tipos de hepatotoxicidad inducida por fármacos***<sup>26</sup>

- Adaptación hepática: la exposición hepática a ciertos fármacos evoca respuestas fisiológicas adaptativas como la inducción de genes de supervivencia relacionados con la formación de antioxidantes, antiinflamatorios y vías antiapoptóticas que atenúan la injuria relacionada con tóxicos exógenos. Este tipo de lesión se evidencia por la elevación transitoria de las enzimas hepáticas, reflejando una injuria leve, que no progresa hacia la mitocondria hepática, membranas celulares y otras estructuras. Ello raramente conllevan a inflamación, muerte celular o importantes cambios histomorfológicos. Esta respuesta protectora adaptativa es interferida por ciertas toxinas como el etanol y la exposición persistente a la toxina, lo que vuelve más vulnerable al hepatocito a futuras injurias.
- Hepatitis inducida por fármacos: los pacientes con hepatitis inducida por fármacos pueden ser asintomáticos o presentar náuseas, vómitos, anorexia y letargia, observándose histológicamente necrosis focal y necrosis en puente en casos severos. Ésta injuria puede llegar a producir hepatitis fulminante.
- Enfermedad hepática no alcohólica: ésta puede ser consecuencia de obesidad, insulino resistencia y alteraciones del metabolismo de los triglicéridos. Clínicamente se hallan síntomas constitucionales, náuseas, vómitos y dolor abdominal, y en el laboratorio se halla hipoglicemia, concentraciones elevadas de transaminasas, tiempo de coagulación prolongado y acidosis metabólica. Este tipo de injuria hepática puede ser reversible en la mayoría de los casos si la exposición al tóxico se detiene. Sin embargo, la

persistencia de éste puede llevar a esteatohepatitis, caracterizada por la presencia de infiltración grasa en el tejido hepático y un incremento significativo del riesgo de progresión a cirrosis.

- Hepatitis granulomatosa: es característica de la lesión hepática producida por alopurinol, quinidina, sulfonamidas y pirazinamida. Clínicamente se manifiesta con fiebre, letargia, mialgias, rash, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia e incremento de la concentración de transaminasa e incluso puede hallarse vasculitis.
- Colestasis: se manifiesta por una elevación asintomática y generalmente reversible de la fosfatasa alcalina y concentraciones de bilirrubina, causadas por una falla en el transporte de las éstas.

La toxicidad hepática producida por fármacos aparece generalmente en los primeros dos meses del tratamiento, sin embargo, puede aparecer en cualquier momento. Clínicamente es indistinguible de la hepatitis viral y se encuentran síntomas generales como dolor en hipocondrio derecho, fatiga, náuseas y vómitos, por lo que se requieren estudios de laboratorio complementarios para su diagnóstico. Siendo la toxicidad hepática inducida por medicamentos un diagnóstico de exclusión.<sup>5</sup>

### ***Farmacología de la rifampicina***<sup>29</sup>

La rifampicina pertenece al grupo de las rifamicinas, las cuales se extraen de los cultivos del *Streptomyces mediterranei*. Mediante hidrólisis y reducción de la rifamicina B se obtiene la rifamicina SV sódica, una droga semisintética más potente que la anterior y que requiere de la vía parenteral para su administración. De esta última



se obtiene el producto sintético rifampicina. Este fármaco se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal y su actividad es la misma al ser administrada vía oral y parenteral. Tras la administración oral, se produce la concentración plasmática máxima en 2 horas, obteniéndose niveles de 6ug/ml con la dosis de 300 mg y 9ug/ml con la de 600 mg. La dosis terapéuticas se logra alcanzar al cabo de 12 a 24 horas dependiendo de la dosis administrada.

La rifampicina posee acción tuberculostática y tuberculicida dependiente de la dosis empleada. La concentración inhibitoria mínima para el *M. tuberculosis* es muy baja, 0.02 ug/ml, por lo que se trata de una droga muy potente, más que la estreptomycin, pirazinamida y etambutol y comparable con la isoniazida. La acción bactericida de este fármaco se lleva a cabo especialmente en bacilos de multiplicación activa, con un potencial de hidrogeniones (ph) ácido o neutro y con menor potencia sobre bacilos de multiplicación lenta. La acción de esta droga es más rápida que la isoniazida y se ha demostrado sinergismo con ésta.

Este fármaco se metaboliza parcialmente en el hígado, donde pierde el grupo acetato en la posición 25, luego de lo cual se excreta la mayor parte en la orina y en la bilis, pasando al intestino, donde es reabsorbido.

Finalmente, la rifampicina posee la capacidad de acelerar su metabolismo, disminuir su vida media, reducir sus niveles plasmáticos e inducir el metabolismo de otras drogas como los estrógenos, produciendo ineficacia parcial de los mismos. Ello se debe al fenómeno de inducción enzimática a nivel de los microsomas hepáticos.

### **Toxicidad por antituberculosos<sup>8</sup>**

Recientemente se ha demostrado que los radicales liberados y el estrés oxidativo que producen constituye el principal mecanismo implicado en la toxicidad hepática inducida por antituberculosos.

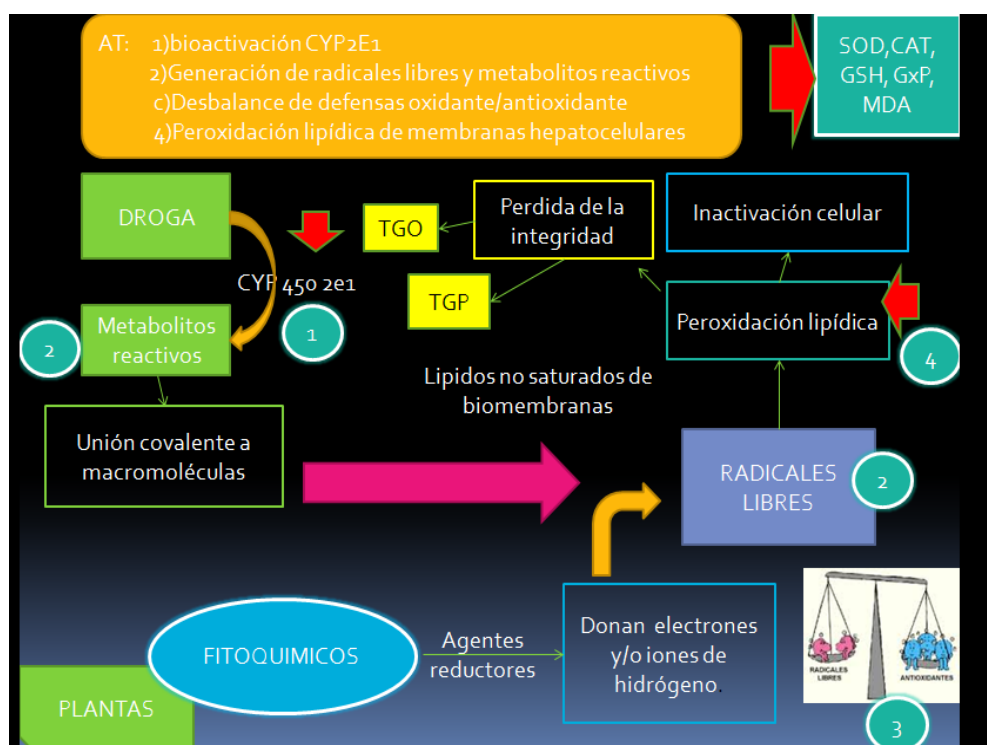
Sude E. *et.al* propone los siguientes mecanismos

- a) bioactivación del citocromo P450 2E1 (CYP 2E1)
- B) generación de radicales libres y metabolitos reactivos
- c) desbalance entre las defensas oxidantes y antioxidantes
- d) peroxidación de las membranas lipídicas que origina la pérdida de la integridad hepatocelular y falla hepática.

Los radicales liberados se forman a partir del exceso de metabolitos reactivos de los antituberculosos, los cuales a su vez, son producidos por la activación del citocromo P450, más específicamente su isoforma CYP450 2E1. El exceso de radicales liberados que no pueden ser contrarrestados por los mecanismos de defensa antioxidante, produce estrés oxidativo. Éstos radicales libres se definen como especies químicas altamente reactivas e inestables que poseen un electrón no apareado, por lo que al llegar a la membrana celular, buscan estabilizarse quitándole un electrón a los

lípidos no saturados de membrana, de ésta manera producen peroxidación lipídica de la membrana. Ello lleva a la pérdida de la integridad celular, salida de las enzimas hepáticas a la circulación y posteriormente inactivación celular por apoptosis.

Dicho mecanismo se muestra en el siguiente esquema:



lutámico oxacélica. TGP: transaminasa glutámico-pirúvica. CAT: catalasa. SOD: superóxido desmutasa. GSH: glutatión. GxP: glutatión peroxidada. MDA: peroxidación lipídica

**Figura 3. Mecanismos de toxicidad por antituberculosos.** Fuente: Sude E. et al.<sup>8</sup>

Por otro lado, los productos naturales poseen diversos fitoquímicos capaces de actuar como agentes reductores al ingresar al organismo. Éstos donan electrones y/o iones de hidrógeno a los

radicales liberados, estabilizándoles y reduciendo el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica de membranas e inactivación celular. Los fitoquímicos pueden también actuar inactivando el citocromo P450 2E1 (disminuyendo la producción de metabolitos reactivos); e incrementando la acción de los sistemas de defensas antioxidantes.

### ***Toxicidad hepática por rifampicina***

La rifampicina por sí sola es capaz de provocar toxicidad hepática en humanos, ratas, ratones y conejos; y de incrementar la toxicidad hepática de otros antituberculosos como la isoniazida y pirazinamida debido a su potente inducción del CYP450.<sup>30</sup>

La biotransformación de la rifampicina inicia con su desacetilación para formar la desacetilrifampicina. Posteriormente ésta se hidroliza y produce 3-formilrifampicina.<sup>5</sup>

El mecanismo de toxicidad hepática propuesto para este fármaco es la alteración de los lípidos de membrana debido a un aumento del estrés oxidativo. La rifampicina daña principalmente la captación de sales biliares y bilirrubina, compitiendo por su unión con proteínas intracelulares; y produciendo lesión hepática de patrón colestásico. Los niveles de bilirrubina disminuyen con la inducción enzimática del glucorónido de bilirrubina por parte de la rifampicina, el cual se une con las bilirrubinas e incrementa su excreción biliar.<sup>4</sup>

Asimismo se conoce que la rifampicina es un potente inductor del CYP450 en el hígado e intestino, incrementando la biotransformación de otros fármacos. Un ejemplo de ello es la inducción de la hidrolasa

de isoniazida, incrementando así potencialmente la producción de hidracina, el cual es el principal metabolito reactivo involucrado en la toxicidad hepática por isoniazida<sup>5</sup>

Clínicamente el daño hepático producido por rifampicina puede manifestarse con anorexia, náuseas, vómitos, malestar general, fiebre, elevación moderada de las transaminasas, bilirrubinas; y colestasis.

### ***Enzimas hepáticas***<sup>11</sup>

Las enzimas hepáticas transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y transaminasa glutámico oxalacética (TGO) juegan un papel importante en el metabolismo del amoníaco. Éste ingresa al cuerpo a través de los aminoácidos y proteínas en la dieta; y es fijado por las nitrogenasas bacterianas en el intestino. Posteriormente es convertido a glutamato y glutamina por la glutamina sintasa. Éstos transfieren sus grupos amino y amida a otros esqueletos de carbono por las transaminasas mediante reacciones de transaminación y transamidación.

Las reacciones de transaminación hacen posible la formación de aminoácidos esenciales utilizando como esqueletos los alfa-cetoácidos contenidos en los alimentos. Es así que la TGO cataliza la reacción hacia la formación de oxalato, mientras que la TGP cataliza otra reacción hacia la formación de piruvato.

La TGP es también útil en las reacciones correspondientes al ciclo de la glucosa-alanina, el cual permite la eliminación de nitrógeno del músculo en forma de úrea. En este proceso, se transfiere carbono y nitrógeno proveniente del músculo esquelético al hígado. Allí ocurre

la unión del piruvato a un grupo amino, convirtiéndolo en alanina. Posteriormente, la TGP transfiere el grupo amino al alfa-cetoglutarato, lo cual permite recuperar el piruvato que servirá como sustrato en la gluconeogénesis y la glucosa resultante regresará al músculo.

En ratas, los niveles normales de dichas enzimas hepáticas, en

GÉNERO	VALORES NORMALES	
	ASAT (u/L)	ALAT (u/L)
<i>Rattus norvegicus</i>	32-92	17-50

Fuente: [http://scielo.sid.cu/scielo.php?pid=S1028-47962006005&script=sci\\_arttext20120308](http://scielo.sid.cu/scielo.php?pid=S1028-47962006005&script=sci_arttext20120308). 2013-01-09

diciones normales y libres de cualquier estrés son:

**Figura 4. Valores normales de enzimas hepáticas en ratas.** Fuente: Veloz D.(2013)<sup>11</sup>

## Silimarina

La silimarina es un suplemento dietético ampliamente utilizado por más de 2000 años proveniente de las semillas de *Sylibum marinum*. En este extracto se hallan flavonoides activos como las Silibinas (isómeros A y B), isosilibinas (A y B), silicristina y silidianina.<sup>30</sup>

La silimarina estabiliza la membrana celular lesionada y logra la regeneración de células hepáticas, lo cual se evidencia por mejoría del estado general, disminución de las molestias digestivas, aumento del apetito y peso y normalización enzimática.<sup>11</sup>

Los principales mecanismos implicados en la potente acción de la silimarina son: la modificación de la membrana celular externa para impedir el ingreso de toxinas a la célula, estimulación de la síntesis de proteínas mediante el incremento de la actividad de la polimerasa A nucleolar (lo cual confiere su propiedad regeneradora de hepatocitos) y su efecto antioxidante, el cual contrarresta la acción de los radicales libres producidos por metabolitos reactivos formados a partir de xenobióticos.

## **2.2 Formulación de hipótesis**

### ***2.2.1 Hipótesis general***

***Hipótesis alterna (H1):*** El extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” posee efecto protector en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

***Hipótesis nula (H0):*** El extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “Boldo” posee efecto protector en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

## **CAPITULO III: Diseño metodológico**

### **3.1 Tipo de investigación**

Se realizó un estudio experimental completo.

### **3.2 Población y muestra de estudio**

#### **Animales de experimentación**

Se utilizaron 24 ratas Holtzman hembra provenientes de los bioterios del Instituto Nacional de Salud **(Anexo N°1)**

#### **Cálculo del tamaño muestral**

Para este estudio se halló el tamaño muestral principal, utilizando los cambios histopatológicos hallados y medidos mediante la escala semicuantitativa de Dalaklioglu, con la siguiente fórmula para comparación de medias:

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$



*Figura 5. Fórmula para el cálculo del tamaño muestral*  
donde:

n: son los individuos necesarios en cada una de las muestras

z:  $\alpha$  es el valor z correspondiente al riesgo deseado

z:  $\beta$  es el valor z correspondiente al riesgo deseado

s: s es la varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia

D: es el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos).

Se acepto un riesgo de 0,05 y se desea una potencia estadística del 90 % para detectar diferencias. Y se estimo una diferencia de medias del 19% y una desviación estándar de 10, Con lo que se obtuvo un tamaño muestra del 6 animales por grupo.

### **Fármacos y reactivos**

La silimarina se compró en su forma comercial de Milk Thistle de Xtralife-Natural Products (60 cápsulas de 250 mg). Cada cápsula fue molida y se diluyeron 2 cápsulas en 12.5 ml de suero fisiológico para obtener una concentración de 40 mg/ml.

La rifampicina (tabletas de 300 mg) se obtuvo en la Farmacia Universal. Se diluyó cada cápsula de rifampicina, previamente molida, 7.5 ml de suero fisiológico hasta alcanzar una concentración de 40 mg/ml.

Y las hojas de Boldo (*Peumus boldus*) se compraron en la casa naturista Martin Rasch y fueron llevadas al Museo de Historia Natural de la UNMSM para su autenticación y clasificación taxonómica  
**(Anexo N°2)**

### **Obtención del extracto acuoso de Boldo (Anexo n°3)**

Se obtuvo el extracto acuoso de boldo mediante el método de infusión, el cual es el más utilizado en la literatura y de manera tradicional.

Para ello primero se dejaron secar las hojas durante dos días en una estufa del laboratorio Khert (ODHG-9030A) a 38°C de temperatura.

Luego, se pesaron 80 gramos de hojas secas en una balanza electrónica, la cual fue calibrada en 00.00 luego de pesar un pedazo de papel aluminio, en el cual fueron colocadas las hojas.

Posteriormente, éstas fueron molidas en un molino de café hasta obtener un polvo fino. El cual se diluyó en 500 cc de agua a 100°C por 30 minutos. De esta manera se obtuvo un extracto acuso de Boldo a una concentración de 160 mg/ml. <sup>10,11</sup>

### **Protocolo de experimentación**

Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales en uno de los bioterios pertenecientes al Instituto de Patología de la UNMSM.

Los animales tuvieron un periodo de aclimatización de 7 días antes de iniciado el experimento, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, en un ambiente estándar con temperatura constante (22±2°C) y 55 ±5% de humedad. Los rangos de temperatura fueron mantenidos mediante la utilización de un calefactor conectado a un termostato que se apagaba automáticamente cuando se excedía del rango. La humedad relativa se mantuvo mediante una bola seca. La temperatura y humedad fueron controladas mediante un higrotermómetro electrónico.

Se alimentaron a las ratas con agua *ad libitum* y 20 gramos de ratina al día (dieta normocalórica y normoproteica.) obtenida del Centro de Ventas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Posteriormente los animales fueron divididos en 4 grupos homogéneos y equitativos de manera aleatoria. Antes del inicio del experimento, las ratas fueron pesadas y se obtuvo una medición basal de TGO, TGP bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y fraccionadas.

Los animales fueron tratados diariamente por 14 días utilizando el siguiente protocolo:

1. Grupo A: éste grupo estuvo constituido por 6 ratas y se le administró un dosis intraperitoneal diaria de solución salina (1ml/kg).<sup>8</sup>
2. Grupo B: éste grupo estuvo constituido por 6 ratas que recibieron 1 dosis intraperitoneal diaria de rifampicina (100 mg/kg).<sup>8</sup>
3. Grupo C: éste grupo estuvo constituido por 6 ratas que recibieron 1 dosis diaria de silimarina ( 200 mg/kg) por canulación gástrica y una hora después recibieron 1 dosis intraperitoneal de rifampicina (100 mg/kg),<sup>8</sup>
4. Grupo D: éste grupo estuvo conformado por 6 ratas que recibieron 1 dosis diaria de extracto acuoso de Boldo (160 mg/kg) por canulación gástrica y 1 hora después recibieron 1 dosis intraperitoneal de rifampicina (100 mg/kg)<sup>8,11</sup>

**Cuadro 1. Esquema de protocolo de experimentación.**

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
<b>Solución salina</b>	Solución salina	Silimarina 200 mg/kg	EAB 160 mg/kg
<b>DESPUES DE 1 HORA</b>			
	R(100 mg/kg)	R(100 mg/kg)	R(100 mg/kg)
<b>DESPUES DE UNA HORA: REALIMENTACION</b>			

### **Análisis bioquímicos (Anexo N°4)**

Con la colaboración y supervisión de un personal experto en obtención muestra sanguínea de ratas, perteneciente al Departamento de Fisiología de la UNMSM, se obtuvieron las muestras necesarias al inicio y al final del experimento para el análisis de enzimas hepáticas (TGO y TGP bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y fraccionadas.

Se utilizó el método de punción cardiaca, para lo que se introdujo la cabeza del animal en una cámara que contenía un pedazo de algodón embebido en éter con el fin de anestesiario por unos segundos. Luego se procedió a punzar en la región precordial con aguja N°27 y jeringa de 3 cc, se aspiró hasta obtener un mínimo de 1 cc de sangre, el cual fue colocado en un tubo seco sin heparina y analizadas utilizando el analizador automático Hitachi y kits reactivos de la casa comercial Wiener lab.

### **Análisis histológico**

Al final de la fase de experimentación, se obtuvo 1 ml de muestra arterial por punción cardiaca de cada animal para el análisis control de enzimas hepáticas (TGO y TGP), bilirrubinas totales y fraccionadas; y proteínas totales y fraccionadas. Luego de lo cual los animales fueron sacrificados por degollamiento y se obtuvieron los hígados intactos.

Los hígados fueron lavados con suero fisiológicos y se valoraron los parámetros macroscópicos como sigue:

- 1) peso: se colocaron los hígados en una balanza electrónica previamente calibrada.
- 2) color: se observó y anotó el color de los hígados ( rojo vinoso, rojo pálido, moteado y moteado con áreas azul violeta)
- 3) tamaño: se midió cada hígado en centímetros, en su largo y ancho.
- 4) aspecto

Posteriormente cada hígado fue cortado y se obtuvieron 4 pedazos representativos y pertenecientes al mismo lóbulo de cada uno, los cuales fueron separados en casetes individuales y embebidos en formol neutro por 48 horas. Finalmente fueron procesados, cortados y embebidos en parafina para su estudio histopatológico y se colorearon con Hematoxilina-eosina (HE). Se obtuvo 1 lámina representativa de cada muestra de tejido hepático y se observaron un promedio de 10 campos a 400X de cada lámina. Dicho proceso fue realizado con ayuda de un personal calificado en corte y tinción de láminas histológicas del Instituto de Patología de la UNMSM.

El análisis histopatológico fue realizado con ayuda y supervisión de un médico Anatómo Patólogo del Departamento de Patología de la UNMSM. Y se valoraron los siguientes parámetros, según la escala propuesto por Dalaklioglu:<sup>32</sup>

**Cuadro 2. Escala de valoración histopatológica de daño hepático.**<sup>31</sup>

	Criterios	Puntaje
1	Núcleos picnóticos y vacuolización perinucleolar	
2	Congestión vascular sinusoidal y dilatación sinusoidal	
3	Número de células de Kupffer activadas	
		TOTAL

Y se colocaron puntajes como sigue: 0:ausente, 1:leve, 2:moderado y 3:marcado.

### 3.3 Variables

#### 3.3.1 Definición operacional de variables

Se definieron y delimitaron las variables a fin de medir el efecto protector del Boldo (*Peumus boldus*) en la toxicidad hepática inducida por rifampicina de acuerdo a los siguientes criterios.

1. Criterios clínicos: se consideró como criterio clínico evidenciable y cuantificable de lesión hepática, la diferencia de pesos entre los diferentes grupos experimentales.
2. Criterios bioquímicos: se midieron los niveles de enzimas hepáticas (TGO y TGP), proteínas totales, bilirrubinas totales y en muestras venosas obtenidas al inicio y al final de la investigación.
3. Criterios histopatológicos: los tejidos hepáticos de los animales fueron analizados mediante criterios morfológicos, de la siguiente manera.
  - Macroscopía: se valoraron los parámetros de peso, color, aspecto y tamaño (largo y ancho).
  - Microscopia: se valoraron mediante la utilización de una escala semicuantitativa que posee los parámetros de: a) núcleos picnóticos y vacuolización perinuclear de hepatocitos, b) congestión vascular en sinusoides y dilatación sinusoidal; y c) número de células de Kupffer activadas. Cada criterio fue valorado como sigue: 0: ausente, 1: leve, 2: moderado, 3: marcado.<sup>31</sup>

### **3.3.2 Operacionalización de variables: ANEXO N°5**

### **3.3.3 Matriz de consistencia: ANEXO N°6**

## **3.4 Procedimientos y análisis de datos**

Los datos fueron analizados en SPSS versión 19 y se presentan en su media y desviación estándar. Para la comparación de variables entre grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, considerándose significativas las diferencias con  $p < 0.05$ .

## **3.5 Consideraciones éticas**

Se rigió mediante las normas y principios éticos establecidos por el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas (CIOM- OMS 1985) para la Investigación Biomédica con Animales.

Asimismo, los animales fueron mantenidos en ambientes de temperatura y humedad aptos para ellos y fueron manipulados con ayuda y supervisión de un médico veterinario experto del Departamento de Cirugía Experimental del INSN y un personal experto del Departamento de Fisiología de la UNMSM.



## CAPITULO IV:

### 4.1 Resultados

En este estudio se utilizaron 24 ratas Holtzman hembra, las cuales fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos: grupo A (control), grupo B (recibió rifampicina 100 mg/kg por vía intraperitoneal), grupo C (recibió silimarina 200 mg/kg por canulación gástrica y 1 hora después recibió rifampicina 100 mg/kg) y grupo D (recibió extracto acuoso de boldo 160 mg/kg por canulación gástrica y luego rifampicina 100 mg/kg por vía intraperitoneal). Dicho protocolo se siguió diariamente durante 14 días.

#### **Parámetro clínico:**

Los animales fueron pesados al inicio y al final del experimento para determinar el efecto del extracto acuoso de las hojas de boldo en la variación de su peso. Se calcularon los promedios de pesos, iniciales, finales y la diferencia de pesos para cada grupo; resultando como sigue:

**Cuadro 3. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el peso de los animales en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

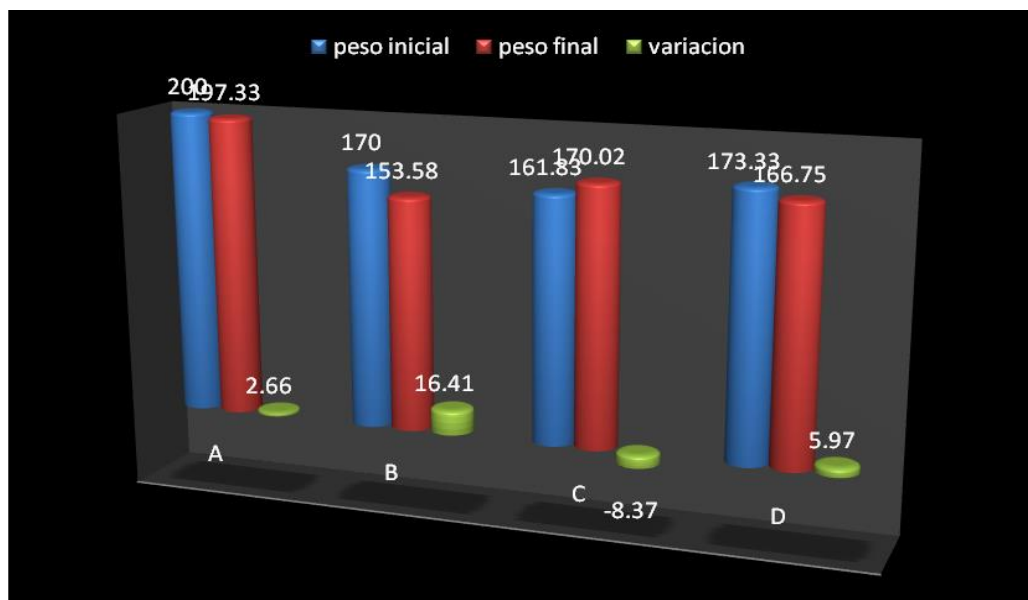
(Se muestran los valores en su media y desviación estándar)

PESO (g)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B RIF(100)*	Grupo C Sil (200) + RIF(100)*	Grupo D RIF (100)+ EAB(160)*	P valor **
<b>Basal</b>	200 +/-0	170 +/-17,8	161, 83 +/-7,75	173,33+/-19,66	0,008
<b>Final</b>	197,33 +/- 1,21	153,58 +/- 2,73	170,2 +/- 4	166,75 +/- 6,16	0,001
<b>VAR*</b>	2, 66 +/-1,21	16, 41 +/-17,94	- 8,36 +/-8,54	5,96 +/- 0,28.	0,000

F=\*RIF= rifampicina, SIL= silimarina, EAB= extracto acuoso de Boldo,

VAR=variación, g=gramos

\*\*P valor =se consideró significativo  $p<0,05$ .



**Figura 6. Comparación de pesos iniciales, finales y variación de peso entre grupos experimentales**

### Parámetros bioquímicos

Se encontró además diferencia significativa en la variación de pesos entre los grupos experimentales (P. Kruskal Wallis,  $p=0,001$ )

#### ***Bilirrubinas totales***

Los promedios de la medición basal de éstas fueron similares en todos los grupos experimentales, no encontrándose diferencia significativa. Al finalizar el experimento la medición final y la variación de bilirrubinas totales fue mayor en el grupo B, comparado con los demás grupos, hallándose diferencia significativa entre los grupos experimentales ( $p=0.00$ )

**Cuadro 4. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de bilirrubina total en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

BT* (mg/dl)	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B RIF* (100)	Grupo C RIF(100)+ SIL(200)*	Grupo D RIF(100)+ EAB(160)*	P valor**
Basal	0.09 +/-0.00	0.06 +/- 0.02	0.07 +/-0.02	0.077 +/-0.02	0.058
Final	0.11 +/-00	0.31+/-0.11	0.13+/-0.03	0.15+/-0.05	0.001
VAR*	0.02 +/-0.00	0.25+/-0.13	0.06+/-0.02	0.08+/-0.58	0.00

\*BT= bilirrubina total (en miligramos/decilitro), RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*P valor: se consideró significativo  $p<0,05$ .

### ***Bilirrubina directa***

Las bilirrubinas directas basales fueron similares en todos los grupos experimentales, no encontrándose diferencia significativa (P. Kruskall Wallis,  $p = 0.62$ ). Mientras que los valores finales de ésta fueron mayores en el grupo B comparado con los demás grupos (A, C y D), hallándose diferencia significativa (P. Kruskall Wallis,  $p = 0.00$ ). Asimismo, se encontró mayor elevación de éste marcador en el grupo B comparado con los demás grupos, siendo éstos resultados significativos (P. Kruskall Wallis,  $p = 0.001$ )

**Cuadro 5. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de bilirrubina directa en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

<b>BD*</b> <b>(mg/dl)</b>	<b>Grupo A</b> <b>Control</b> <b>(solución</b> <b>salina)</b>	<b>Grupo B</b> <b>RIF (100)*</b>	<b>Grupo C</b> <b>RIF(100)+</b> <b>SIL(200)*</b>	<b>Grupo D</b> <b>RIF(100)+</b> <b>EAB(160)*</b>	<b>P</b> <b>valor*</b> <b>*</b>
<b>Basal</b>	0.02 +/- 0.00	0.02 +/- 0.15	0.03 +/-0.04	0.02 +/-0.01	0.62
<b>Final</b>	0.03 +/- 0.01	0.23+/-0.10	0.06+/-0.01	0.06+/-0.02	0.00
<b>VAR*</b>	0.01 +/-0.01	0.21+/-0.12	0.03+/-0.04	0.05+/-0.3	0.001

\*BD= bilirrubina directa (en miligramos/decilitro), RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideró significativo  $p < 0,05$ .

### ***Bilirrubina indirecta***

Los valores iniciales también fueron similares en los 4 grupos. Por su parte, no se encontró diferencia significativa en cuanto a los promedios finales de ésta ni su variación entre los grupos experimentales.

**Cuadro 6. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de bilirrubina indirecta en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

<b>BI (mg/dl)</b>	<b>A Control (solución salina)</b>	<b>B RIF (100)</b>	<b>C RIF(100)+ SIL(200)</b>	<b>D RIF(100)+ EAB(160)</b>	<b>P valor</b>
<b>Basal</b>	0.07 +/- 0.00	0.04+/-0.018	0.06 +/-0.03	0.06+/-0.01	0.039
<b>Final</b>	0.08 +/- 0.01	0.05+/-0.04	0.07+/-0.02	0.09+/-0.04	0.246
<b>VAR*</b>	0.01 +/-0.01	0.01 +/-0.05	0.01+/-0.02	0.14+/-0.28	0.872

\*BI= bilirrubina indirecta (en miligramos/decilitro), RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideró significativo  $p < 0,05$ .

### ***Proteínas totales***

Los valores basales de este marcador fueron similares en todos los grupos y no se halló diferencia significativa entre ellos (P. Kruskal Wallis,  $p=0.752$ ) . Al final del experimento, los valores control fueron más elevados en los grupos C y D, comparados con el grupo B, hallándose diferencia significativa (P. Kruskal Wallis,  $p=0.001$ ). También se encontró que éste marcador aumentó más su valor en los grupos C y D, en comparación con el grupo B, siendo éstos resultados significativos (P. Kruskal Wallis,  $p=0.008$ )

**Cuadro 7. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de proteínas totales en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

PT (g/dl)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B RIF (100)*	Grupo C RIF(100)+ SIL(200)*	Grupo D RIF(100)+ EAB(160)*	P valor **
Basal	6.49 +/-0.11	6.48 +/-0.44	5.52+/-2.68	6.57 +/-0.35	0.752
Final	6.74 +/- 0.18	6.96+/-0.25	7.5+/-0.34	7.55 +/-0.26	0.001
VAR*	0.24+/-0.3	0.66+/-0.38	2.05+/-2.71	0.98+/-0.19	0.008

\*PT= proteínas totales (en gramos/decilitro), RIF=rifampicina,  
SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideró significativo  $p<0,05$ .

### **Albúmina**

No se halló diferencia significativa en cuanto a la medición basal de albúminas entre los grupos experimentales (P. Kruskal Wallis,  $p=0.182$ ). Mientras que la medición final de ésta fue más elevada en los grupos C y D, comparados con el grupo B, hallándose diferencia significativa entre los grupos (P. Kruskal Wallis,  $p=0.006$ ). Éste marcador se elevó más en el grupo C comparado con el grupo D y B ; hallándose diferencia significativa entre los grupos.

**Cuadro 8. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de albúmina en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

ALB (g/dl)*	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B RIF (100)*	Grupo C RIF(100)+ SIL(200)*	Grupo D RIF(100)+ EAB(160)*	P valor **
<b>Basal</b>	4.08+/-0.33	4.2 +/-0.09	3.57 +/-1.7	4.22 +/- 0.13	0.182
<b>Final</b>	4.3 +/- 0.29	4.53+/-0.28	4.96 +/-0.17	4.9+/-0.14	0.006
<b>VAR*</b>	0.1+/-0.01	0.33+/-0.35	1.39+/-1.66	0.69+/-0.18	0.008

\*ALB= albúmina (en gramos/decilitro), RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideró significativo  $p<0,05$ .

### ***Globulinas***

No se halló diferencia significativa en la medición basal y final de éste marcador entre los grupos experimentales.

**Cuadro 9. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de globulina en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

<b>GLOB (g/dl)*</b>	<b>Grupo A Control (solución salina)</b>	<b>Grupo B RIF (100)*</b>	<b>Grupo C RIF(100)+ SIL(200)*</b>	<b>Grupo D RIF(100)+ EAB(160)*</b>	<b>P valor **</b>
<b>Basal</b>	2.42+/-0.08	2.33 +/-0.38	2.01 +/-0.98	2.35 +/-0.33	0.407
<b>Final</b>	2.43 +/- 0.11	1.7 +/-1.34	1.79 +/-1.4	2.64+/-0.15	0.215
<b>VAR*</b>	0.02 +/-0.02	-0.63+/-1.5	-0.21+/-1.83	0.29+/-0.19	0.410

\*GLOB=globulina (en gramos/decilitro), RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideró significativo  $p < 0,05$ .



### ***Transaminasa glutámico oxalacética (TGO)***

No se halló diferencia significativa en la medición basal (P. Kruskall Wallis,  $p=0,811$ ) ni en la variación de ésta en los grupos experimentales (P. Kruskall Wallis,  $p=0,438$ ). Sin embargo, la medición final de TGO fue mayor en el grupo B, comparado con los grupos A, C y D; siendo la diferencia significativa (P. Kruskall Wallis,  $p=0,035$ )

**Cuadro 10. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de TGO en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

<b>TGO (UI/L)*</b>	<b>Grupo A Control (solución salina)</b>	<b>B RIF (100)*</b>	<b>C RIF(100)+ SIL(200)*</b>	<b>D RIF(100)+ EAB(160)*</b>	<b>P valor **</b>
<b>Basal</b>	142.5 +/-6.12	131.67 +/-18.34	136.33 +/-18.35	141 +/-13.96	0.811
<b>Final</b>	159.67 +/- 3.27	180.5+/-10.19	172.83 +/-22.37	174.33+/-24.75	0.035
<b>VAR*</b>	17.17 +/-9.39	-28.67+/-124.08	-19.67+/-183.57	29+/-19.33	0.438

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

\*TGO= transaminasa glutámico oxalacética (en unidades internacionales/litro),  
RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideóa significativo  $p<0,05$ .

### ***Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)***

En la medición basal de TGP no se halló diferencia significativa entre los grupos (P. Kruskall Wallis,  $p=0,273$ ), mientras que en la medición final, la ésta se halló más elevada en el grupo B comparado con los demás grupos, siendo los resultados significativos (P. Kruskall Wallis,  $p=0,009$ ). También se encontró una mayor elevación de ésta enzima en el grupo B, comparado con los demás grupos, hallándose resultados significativos (P. Kruskal Wallis,  $p=0.002$ ).

**Cuadro 11. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en los niveles séricos de TGP en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

<b>TGP (UI/L)*</b>	<b>Grupo A Control (solución salina)</b>	<b>Grupo B RIF (100)*</b>	<b>Grupo C RIF(100)+ SIL(200)*</b>	<b>D RIF(100)+ EAB(160)*</b>	<b>P valor **</b>
<b>Basal</b>	39.5+/-1.22	54.5 +/-32.86	42.33 +/-4.23	39.33 +/-5.01	0.273
<b>Final</b>	50 +/-2.45	70.67 +/-13.28	51.33+/-7.58	52 +/-6.16	0.009
<b>VAR*</b>	10.5+/-3.67	48.83+/-17.72	36.5+/-38.29	33.33+/-16.18	0.02

\*TGP= transaminasa glutámico pirúvica (en unidades internacionales/litro),  
RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo, VAR=variación.

\*\*Pvalor: se consideró significativo  $p<0,05$

**Macroscopía hepática:**

- a) **Grupo A:** mostraron un color rojo vinos , aspecto liso y sin lesiones aparentes. (Figura 7A)
- b) **Grupo B:** mostraron un color rojo pálido con áreas moteadas, zonas azul violetas y un aspecto congestivo (Figura 7B)
- c) **Grupo C:** tuvieron un color rojo pálido y aspecto no congestivo (Figura 7C)
- d) **Grupo D:** mostraron un color rojo pálido con áreas moteadas y un aspecto no congestivo. (Figura 7D)



Figura 7A



Figura 7B



Figura 7C

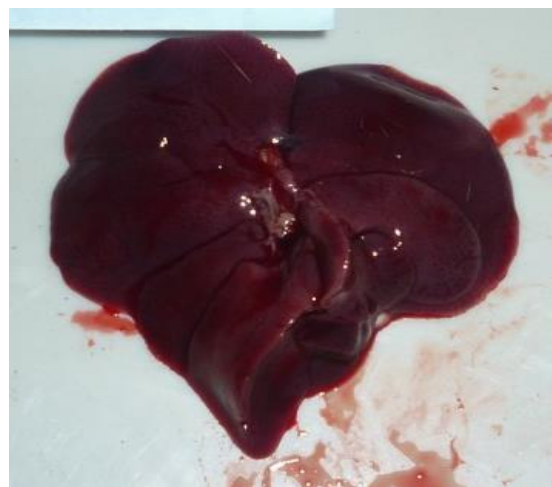


Figura 7D

**Figura 7. Aspectos macroscópicos de los hígados en los grupos experimentales.**

### **Peso de los hígados:**

La media de peso de los hígados fue mayor en el grupo B (7,6  $\pm$  0,54), en comparación con el grupo A (6,3  $\pm$  0,9), C (5,7  $\pm$  0,9) y D (5,9  $\pm$  0,28). Hallándose diferencia significativa entre los grupos experimentales hígados (P. Kruskal Wallis,  $p=0,007$ )

**Cuadro 12. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el peso de los hígados en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

Grupo	A	B	C	D	P
	Control (solución salina)	RIF (100)*	RIF(100)+ SIL(200)	RIF(100)+ EAB(160)	valor **
<b>Peso (g)*</b>	6,3 $\pm$ 0,9	7,6 $\pm$ 0,54	5,7 $\pm$ 0,9	5,9 $\pm$ 0,28	0,007

\*RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo,  
VAR=variación, g=gramos.

\*\*P valor: se consideró significativo  $p<0,05$ .

### ***Largo de los hígados:***

La media de largo de los hígados también fue mayor en el grupo B (6,00 +/-0,18), en comparación con el grupo A (4,55 +/- 0,15), C (4,51 +/-0,52) y D (4,23 +/-0,53). Hallándose diferencia significativa entre los grupos experimentales P. Kruskal Wallis,  $p=0,002$ )

**Cuadro 13. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el largo de los hígados en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

Grupo	A	B	C	D	P valor
	Control (solución salina)	RF (100)*	RIF(100)+ SIL(200)*	RIF(100)+ EAB(160)*	**
<b>Largo (cm)*</b>	4,55 +/- 0,15	6,00 +/-0,18	4,51 +/-0,52	4,23 +/-0,53	0,002

\*RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo,  
VAR=variación, cm=centímetros.

\*\*P valor: se consideró significativo  $p<0,05$ .

### ***Ancho de los hígados:***

La media de ancho de los hígados fue mayor en el grupo B (4,66 +/- 0,39), en comparación con el grupo A (2,65 +/-0,21), C (2,51 +/-0,24)

y D (2,36  $\pm$  0,2). Hallándose diferencia significativa entre los grupos experimentales. (P.Kruskall Wallis,  $p=0,001$ )

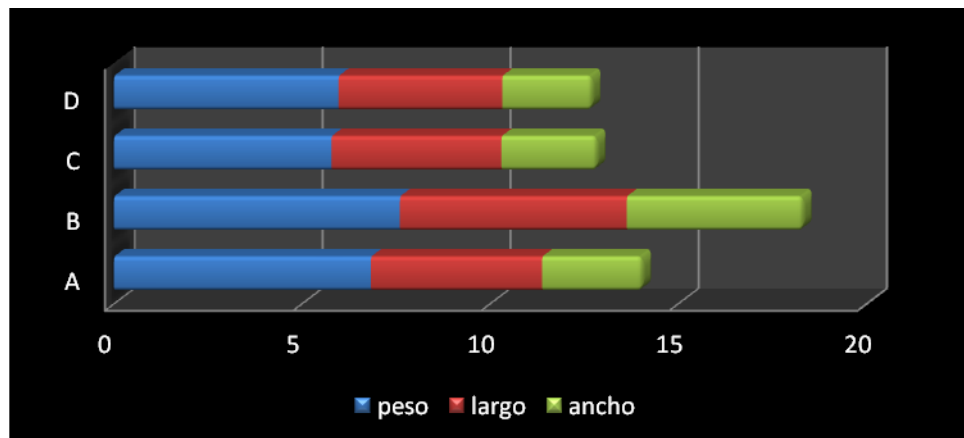
**Cuadro 14. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en el ancho de los hígados en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas.**

(Se muestran los valores en medias y desviación estándar).

Grupo	A	B	C	D	P
	Control (solución salina)	RIF (100)*	RIF(100)+ SIL(200)*	RIF(100)+ EAB(160)*	valor **
Ancho (cm)*	2,65 $\pm$ 0,21	4,66 $\pm$ 0,39	2,51 $\pm$ 0,24	2,36 $\pm$ 0,2	0,001

\*RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo,  
VAR=variación, cm=centímetros.

\*\*P valor: se consideró significativo  $p<0,05$ .

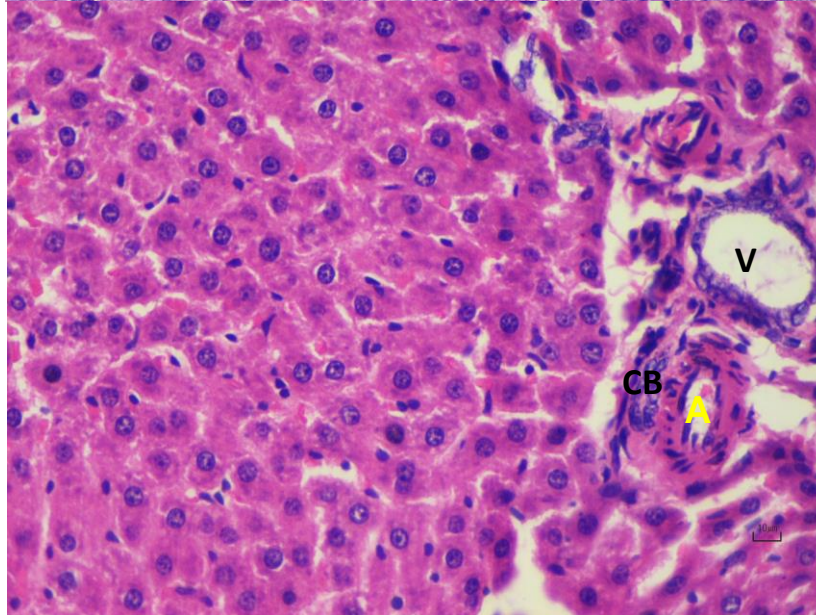
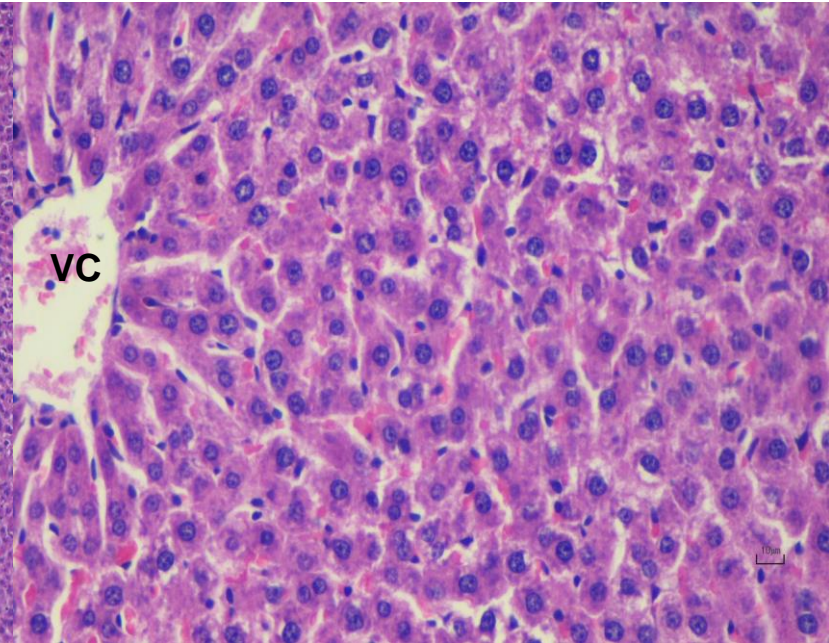
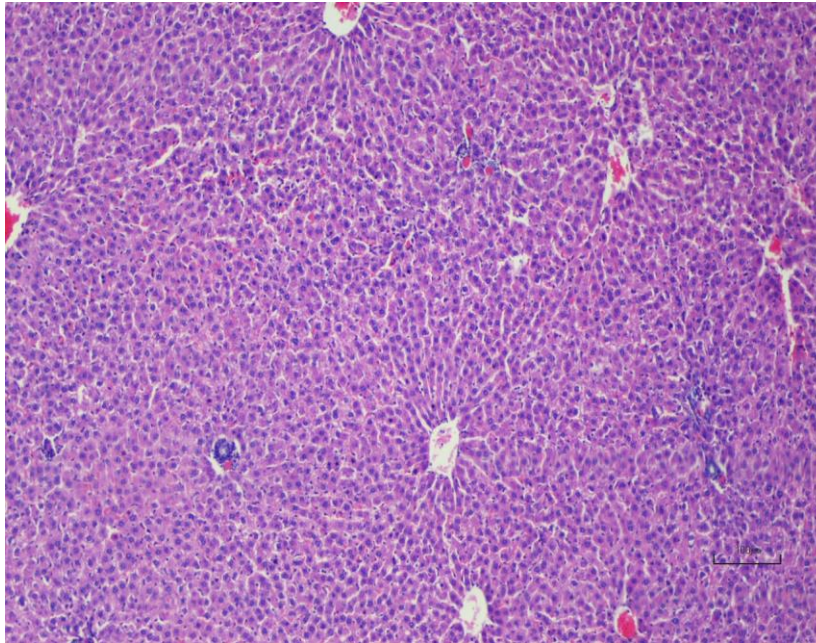


**Figura 8. Comparación de promedios de peso, largo y ancho de los hígados entre los grupos experimentales.**

**Cambios histopatológicos:**

- a) Grupo A: se encontraron lobulillos con estructura normal (Figura 9.A1-H&E, 100X y Figura 9-A2-H&E-400X) y espacio porta normal (Figura 9 A-3 H&E-400X)
- b) Grupo B: se muestran lobulillos hepáticos con gran vacuolización intracitoplasmática (espacios blancos alrededor del núcleo), desarreglo de la arquitectura (Figura 9.B1-H&E, 100 X). y , núcleos picnóticos, congestión vascular de sinusoides y dilatación sinusoidal e incremento de las células de Kupffer alrededor del espacio porta.(Figura 9.B2-H&E, 400X).
- c) Grupo C: se muestra lobulillo hepático con moderada congestión vascular de sinusoidal y estructura conservada. (Figura 9.C1-H&E, 100X) y espacio portal normal (Figura 9C2-H&E,400X)
- d) Grupo D: se muestra lobulillo hepático con estructura conservada, leve congestión sinusoidal y espacio porta normales (Figura 9.D1-H&E, 400X) y cordones hepáticos organizados alrededor de la vena centrolobulillar. (Figura 9.D2-H&E,400X)



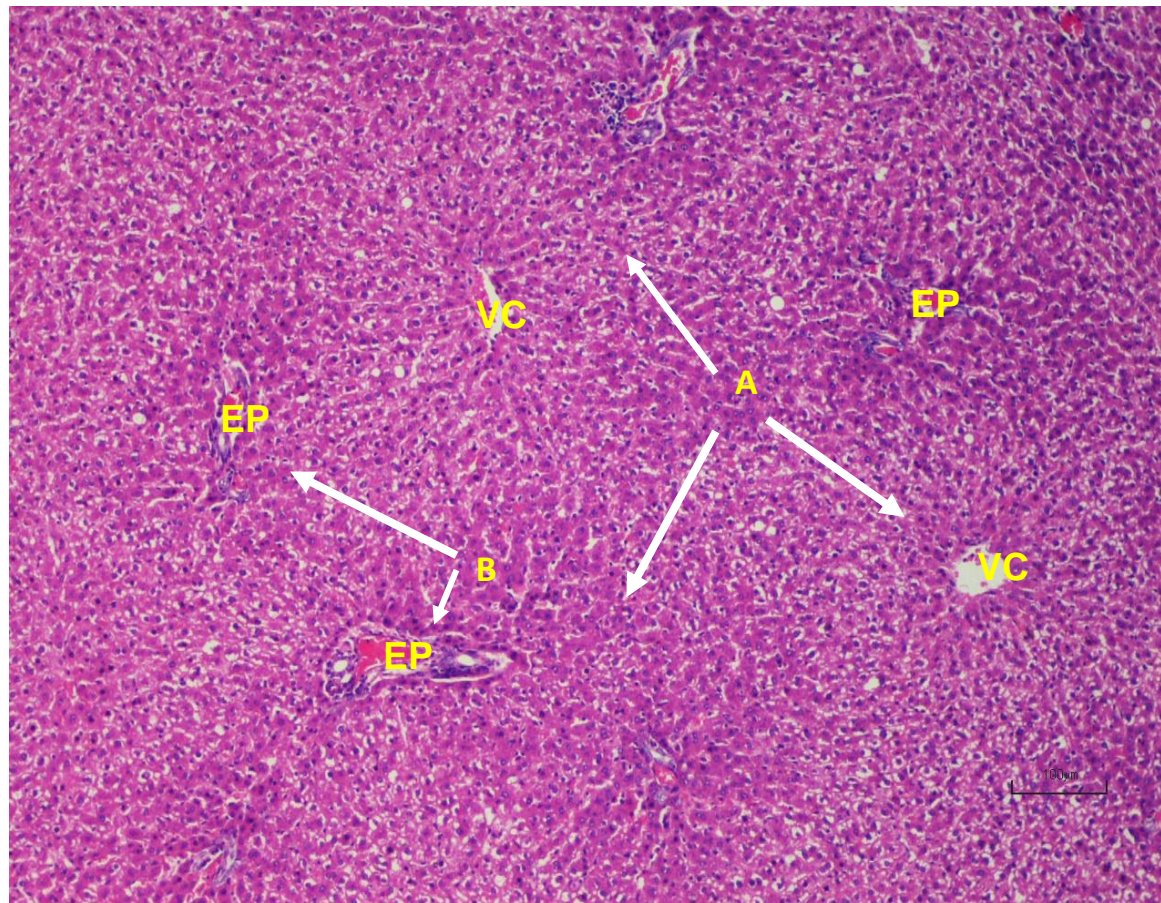


*Figura 9 A-1:* Se observa microfotografía de hígado de control ( grupo A), mostrando lobulillos hepáticos y espacio porta (EP) normales.

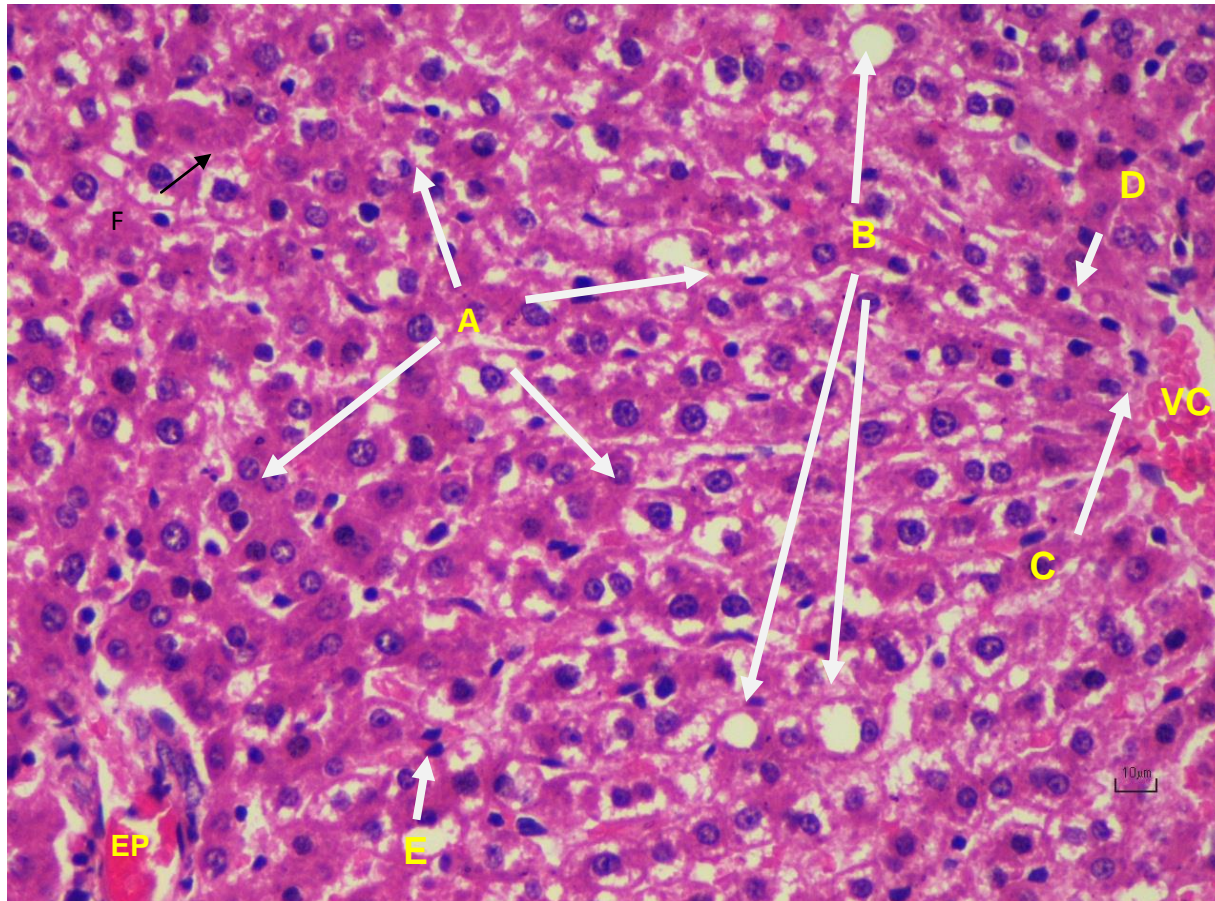
*Figura 9 A-2.* Fotomicrografía de hígado normal. Se observan trabéculas de Remak (TR) ordenadas alrededor de la vena centrolobulillar.(V)

*Figura 9 A-3.* Corte histológico del grupo control. Espacio porta normal. A: arteria. V: vena. CB: conducto biliar.



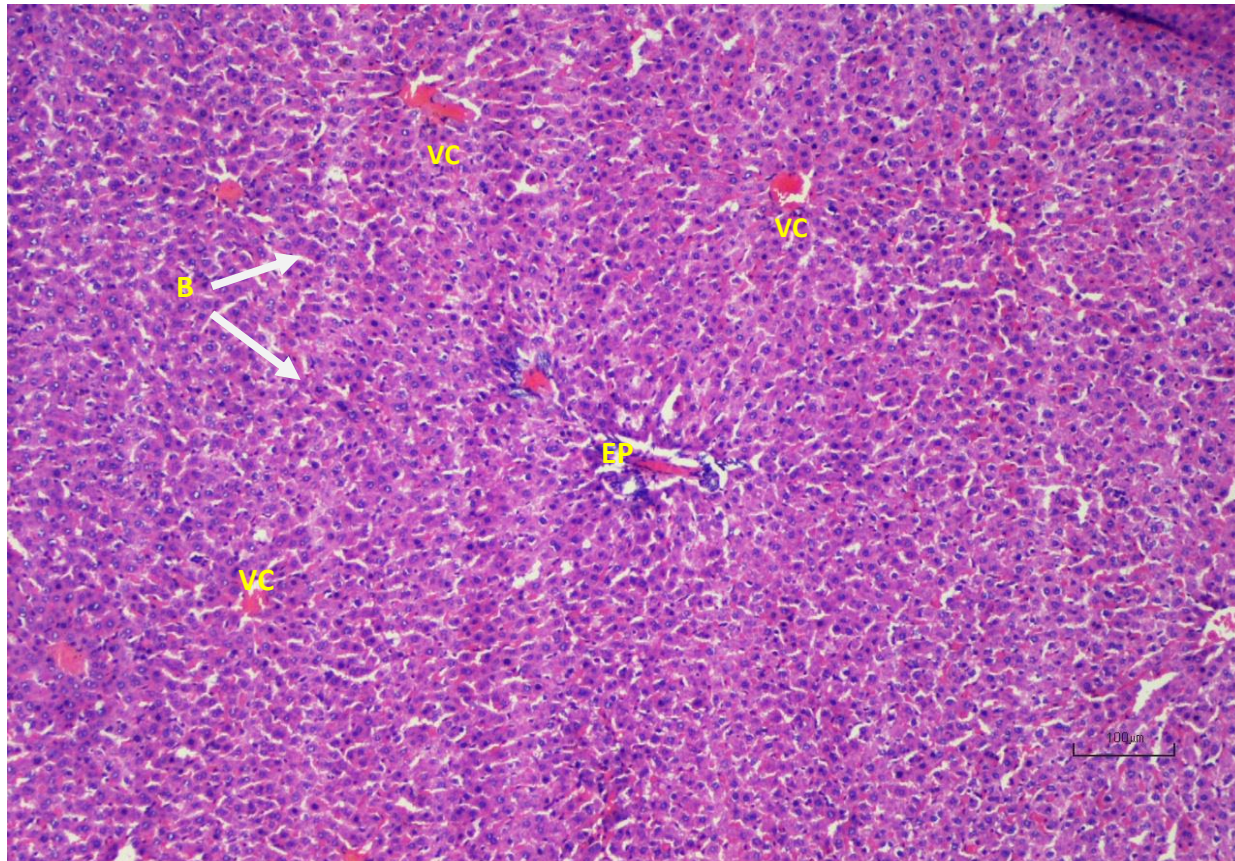


*Figura 9B1-* Corte histológico de hígado de los animales que recibieron rifampicina. Se observa marcada microvacuolización (A) que lleva a la desorganización hepatocelular. Y espacios porta (EP) con abundantes células de Kupffer hiperplásicas (B)VC:vena centrolobulillar. (H&E-100x)

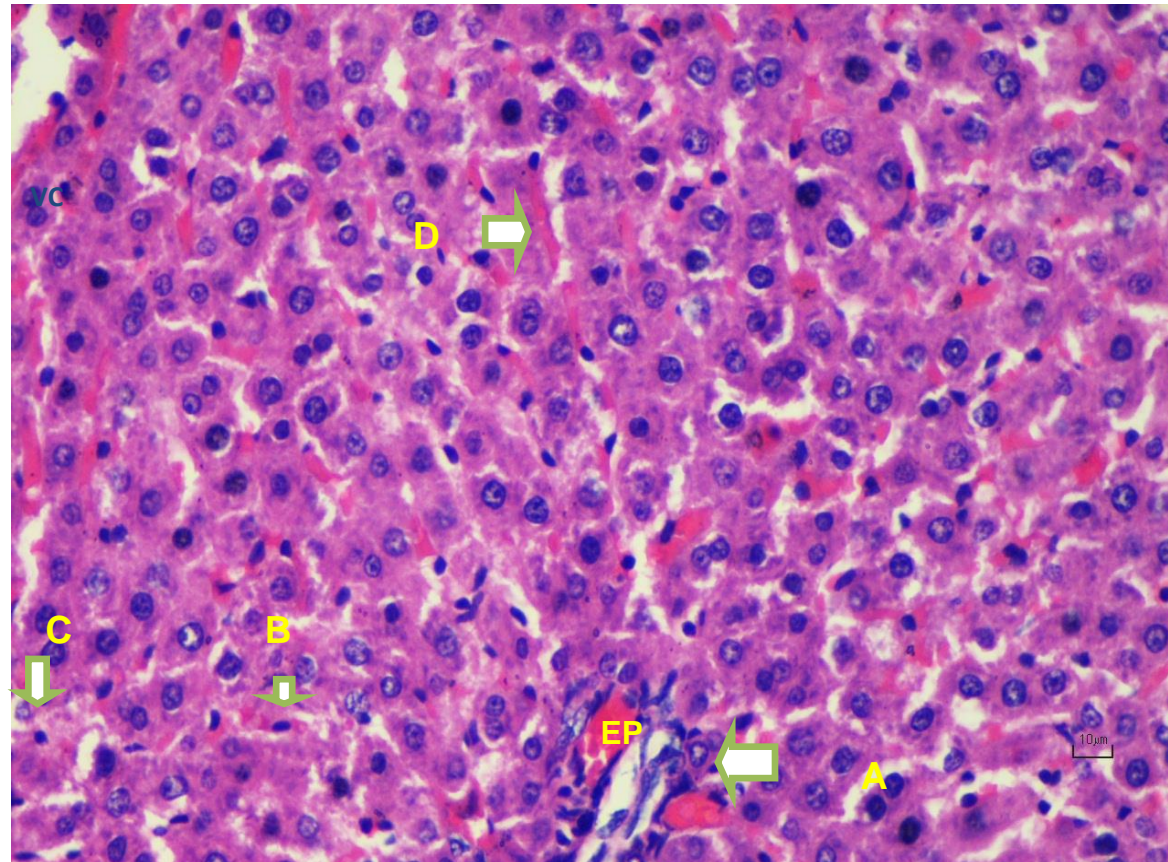


*Figura 9 B2-Lobulillo hepático de hígado de animales que recibieron rifampicina. Se observa marcada microvacuolización (A), que lleva a la esteatosis (B) en algunas zonas. Abundantes células de Kupffer activadas (C). Núcleo apoptótico (D) Núcleo picnótico. Y Cariorrhexis (F) EP:espacio porta. VC: vena centrolobulillar.(H&E-400X)*



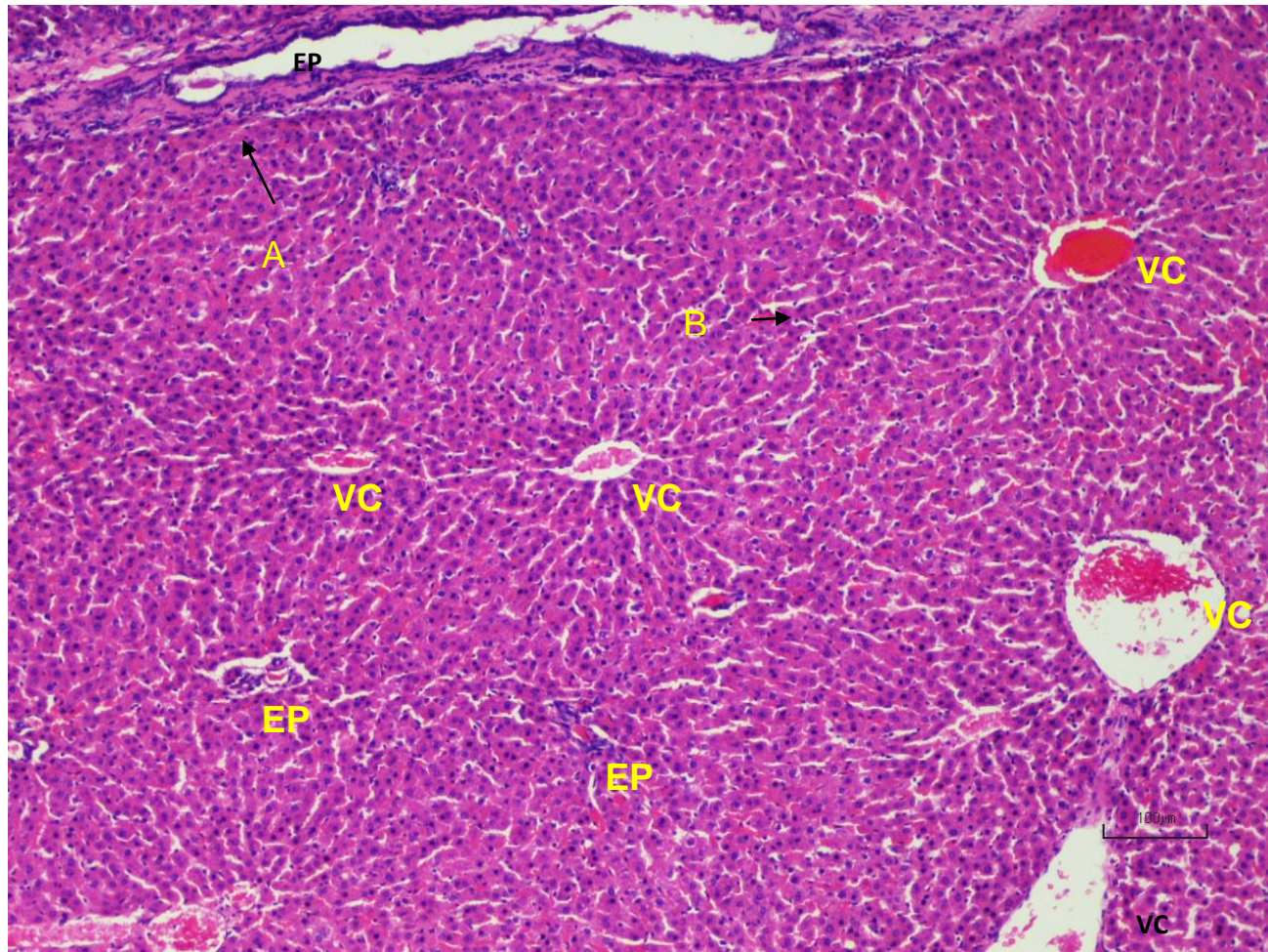


*Figura 9 C-1:* Se muestra lobulillo hepático representativo de los animales que recibieron silimarina..Se observa arquitectura hepatocelular conservada, zonas de edema (A. Leve congestión sinusoidal.(H&E-100X)



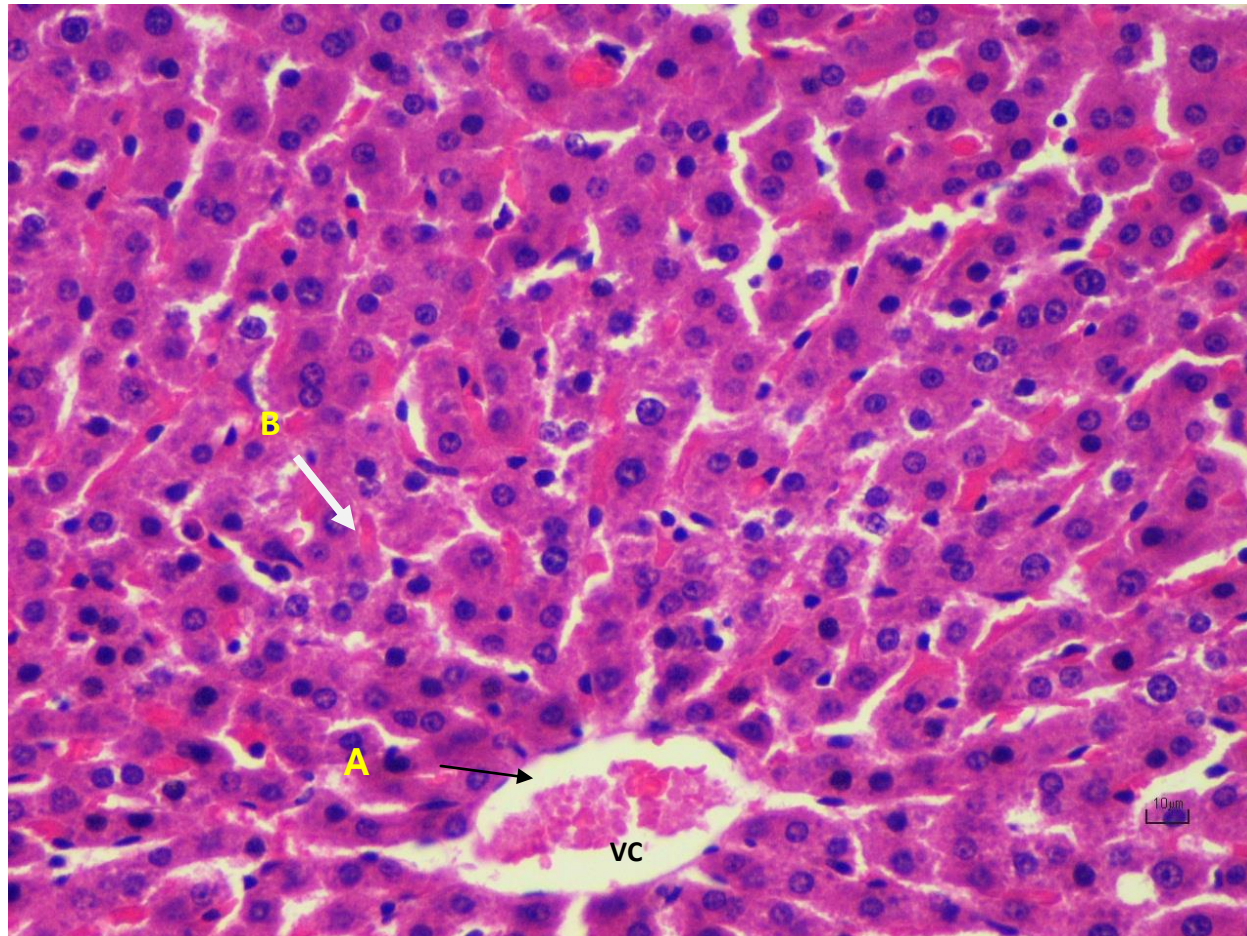
*Figura 9 C2-* Tejido hepático representativo de animales que recibieron silimarina. Se observa arquitectura hepática similar al normal. Espacio de porta (EP) con algunas células de Kupffer activadas (A). Algunos Núcleos picnoticos (B), nucleos apoptoticos(C). y leve congestión sinusoidal (D) (H&E-400X)





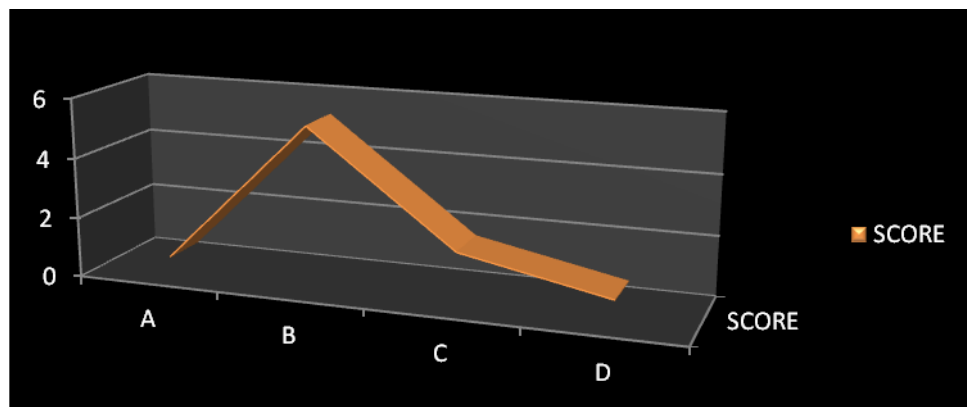
*Figura 9D-1.* Se observa tejido hepático representativo de los animales que recibieron EAB. Se observa cordones de hepatocitos regulares alrededor de la vena centrolobulillar (VP) y espacio porta(EP) con algunas células de Kupffer hiperplásicas(A) y leve congestión sinusoidal (B)





*Figura 9 D2*-Se observa lobulillo hepático con hepatocitos en cordones alrededor de la vena centrolobulillar (VC). Se hallan algunas células de Kupffer activadas (A) y leve congestión sinusoidal (B)(H&E-400X)

Se aplicó una escala semicuantitativa para valorar los cambios histopatológicos, hallándose un puntaje total mayor para el grupo B (5,33  $\pm$  0,51), en comparación con el grupo A (0,55  $\pm$  0,54), C (1,66  $\pm$  0,51) y D (0,66  $\pm$  0,81). Se halló diferencia significativa entre los grupos experimentales en cuanto al puntaje total obtenido (P.Kruskal Wallis,  $p=0,001$ )



**Figura 10. Comparación de cambios histopatológicos entre los grupos experimentales**



**Cuadro 15. Efecto del extracto acuoso de *Peumus boldus* en la morfología hepática en la toxicidad inducida por rifampicina en ratas.**

	Grupo A Control (solución salina)	Grupo B RIF(100)	Grupo C RIF(100)+ SIL(200)	Grupo D RIF(100)+ EAB(160)	P valor**
<b>Peso hígado</b>	6,3 +/-0,9	7,6 +/-0,54	5,7 +/-0,9	5,9 +/- 0,28	0,007
<b>Largo hígado</b>	4,55 +/- 0,15	6,00 +/-0,18	4,51 +/-0,52	4,23 +/-0,53	0,002
<b>Ancho hígado</b>	2,65 +/-0,21	4,66 +/-0,39	2,51+/-0,24	2,36 +/-0,2	0,001
<b>Macroscopía</b>	Color rojo vinoso , aspecto liso, sin lesiones aparentes.(Figura 6A)	Color rojo pálido con áreas moteadas y azul violetas ;y aspecto congestivo (Figura 6B)	Color rojo pálido, aspecto no congestivo. (Figura 6C)	Color rojo pálido con áreas motedas, aspecto no congestivo. (Figura 6D)	
<b>Microscopía</b>	se encontraron lobulillos con estructura normal y leve congestión por la manipulación	Se muestran lobulillos hepáticos con gran vacuolización intracitoplasmática (espacios blancos	se muestra lobulillo hepático con moderada congestión vascular de sinusoidal y	se muestra lobulillo hepático con estructura conservada, leve congestión sinusoidal (Figura	

	(Figura 8.A-H&E, 400X).	alrededor del núcleo), desarreglo de la arquitectura, núcleos picnóticos, congestión vascular de sinusoides y dilatación sinusoidal (Figura 8.B1-H&E, 400 X). y leve inflamación portal.(Figura 8.B2-H&E, 400X).	estructura conservada. (Figura 8.C1-H&E, 400X) y espacio portal normal (Figura 8C2-H&E,400X)	8.D1-H&E, 400X) y espacio porta normales (Figura 8.D2-H&E,400X)	
<b>Score</b>	0,55 +/- 54	5,33 +/-0,51	1,66 +/-0,51	0, 66 +/- 0,81	0,001

\*RIF=rifampicina, SIL=silimarina, EAB=extracto acuoso de boldo. Se presentan los valores en su media y desviación estándar.

\*\*P valor, se consideró significativo  $p < 0,005$ .

## 4.2 Discusiones

Recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo es el mecanismo principal implicado en la injuria hepática inducida por rifampicina, lo cual ha sido evidenciado mediante el incremento de la peroxidación lipídica, niveles de la enzima glutatión oxidasa y lesiones histopatológicas halladas en el trabajo realizado por Bakare *et.al.*<sup>18</sup>

Ello lleva a pensar que los productos con propiedades antioxidantes, como el *Peumus boldus*, podrían reducir los efectos tóxicos de la rifampicina en el tejido hepático.

Por lo que en este estudio se propuso determinar el efecto protector de las hojas de *Peumus boldus* en la toxicidad hepática inducida por rifampicina. Éste producto natural, contiene en sus hojas concentraciones abundantes del alcaloide boldina. Habiéndose demostrado que ésta previene el daño mediado por vías enzimáticas y no enzimáticas en sistemas biológicos e invitro inhibe el daño peroxidativo de las membranas celulares mediados por radicales libres<sup>17</sup> y habiendo sido confirmado su efecto protector en la hepática inducida por paracetamol.<sup>10,11</sup>

En esta investigación se eligió trabajar con ratas como modelos experimentales debido a que diversos estudios han documentado la mayor susceptibilidad de éstas a la injuria hepática. Sin embargo, se han propuesto otros modelos experimentales en los que se utilizan perros, cerdos y conejos (Sarich *et.al.*)<sup>31,33</sup>

En este estudio se utilizaron ratas de un solo género y se escogieron hembras debido a que los machos metabolizan más rápidamente las drogas , con lo que existe menor exposición de sus metabolitos al organismo, lo que los hace menos susceptibles a las injurias por drogas.

En cuanto al protocolo, se siguió el propuesto por Eminzade S. *et .al.*, por lo que se administró la rifampicina a dosis mucho mayores a los utilizados en los seres humanos. Ello se justifica debido a que en ratas se requieren mayores dosis de éste para producir hepatotoxicidad debido a que éstas la metabolizan más rápidamente y a que la duración del tratamiento en éstas fue mucho más corto al tratamiento en humanos.<sup>31</sup>

En cuanto a la vía de administración, en este estudio se utilizó la vía intraperitoneal, sin embargo en otros estudios la vía de administración fue intragástrica debido a que ésta es la principal vía utilizada en el tratamiento contra la tuberculosis en humanos. Por ésta vía, el fármaco se absorbe rápidamente y casi por completo (90%), llegando a sus concentraciones máximas a las 1.5-4 horas luego de su administración.<sup>33</sup>

Asimismo, la rifampicina fue administrada luego de un periodo de ayuno en los animales y 1 hora después del EAB debido a que se ha documentado la disminución de su absorción cuando se administra simultáneamente con alimentos y para evitar sus interacciones ,respectivamente.<sup>33,34</sup>

La toxicidad inducida por rifampicina fue evidenciable en el grupo B debido a la mayor pérdida de peso en los animales de este grupo comparado con los grupos A y D, en contraste se halló un incremento de peso en el grupo C. Ello podría explicarse por la disminución del apetito en los animales del grupo B debido a la injuria

hepática producida por rifampicina, mientras que en los grupos que recibieron EAB y silimarina se evidenció protección hepática al no encontrarse diferencia significativa de peso con el control; éstos hallazgos se corroboran con los resultados encontrados por Veloz D.

11

En el perfil hepático, se halló que los valores finales de bilirrubina total, bilirrubina directa TGO y TGP fueron mayores en el grupo B, en comparación con el grupo A, C y D (siendo mayor en el grupo C que en el D). Por el contrario, los niveles de proteínas totales y albúmina fueron menores en el grupo B comparado con los otros grupos siendo similares entre los grupos C y D. Ello se podría explicar debido a que la injuria hepática inducida por rifampicina conlleva a la pérdida de la integridad de la membrana hepatocelular y por lo tanto a la salida de las enzimas hepáticas a la circulación, produciendo la elevación de sus niveles séricos. Ello se corrobora por los hallazgos encontrados en el trabajo realizado por Ashish *et.al.*<sup>35</sup>

Niveles elevados de TGO indican daño hepático, como el causado por hepatitis viral, sin embargo también pueden indicar infarto cardiaco y daño muscular. En contraste, la TGP, al ser la responsable de catalizar la conversión de piruvato a alanina y glutamato, se localiza más específicamente en el tejido hepático por lo que resulta ser mejor parámetro de hepatotoxicidad.<sup>356</sup>

Por su parte, la elevación de bilirrubinas indica que existe también un componente colestásico, junto con el hepatocelular.<sup>37</sup>

La bilirrubina es un producto de la destrucción de los glóbulos rojos, que es eliminado de la circulación mediante su conjugación hepática y secretado en la bilis. Sin embargo, los niveles de ésta pueden incrementarse cuando disminuye su captación hepática, disminuye

su conjugación, su secreción o existe un bloqueo en las vías biliares. La administración de antituberculosos incrementa los niveles séricos de éste marcador, demostrándose ello en este estudio y encontrándose que la administración del EAB como pretratamiento logró normalizar las concentraciones séricas de las bilirrubinas.<sup>35</sup>

Por lo mencionado anteriormente, se puede inferir que la administración de EAB revirtió significativamente la elevación de marcadores séricos como las enzimas TGO, TGP y niveles de bilirrubinas totales e incrementó la síntesis hepática de proteínas y con ello sus niveles séricos.<sup>38</sup>

En la macroscopía hepática se observó que los hígados del grupo control conservaron su color rojo vinoso y aspecto normal, mientras que los tejidos hepáticos del grupo B se observaron congestivos, incrementados de peso y tamaño, y color mostraron un color rojo palido con áreas moteadas y múltiples zonas azul violeta que representarían lesiones hepáticas. Mientras que los grupos C y D, conservaron un aspecto, peso y tamaños similares al control. Y los hígados del grupo C tuvieron un color rojo pálido, y los del grupo D, un color rojo pálido con áreas moteadas.

Se halló que los hígados del grupo B pesaron, y midieron más que los de los grupos A, C y D. Hallándose también que los del grupo D pesaron más que los del grupo C, mientras que éstos últimos fueron más largos y anchos en comparación con los del grupo D. Ello podría explicarse por una mayor lesión hepática producida por la rifampicina en el grupo B. Éstos hallazgos se corroboran con los encontrados en el trabajo realizado por Nitin *et.al*, donde se evidencia que la injuria hepática inducida por rifampicina incrementa el peso de los hígados en modelos experimentales, por lo que los resultados hallados en este estudio indican que el EAB previno el aumento de peso de los

hígados en el grupo D en comparación con el grupo B, siendo éstos resultados comparables al grupo que recibió pretratamiento con silimarina.<sup>39</sup>

En la literatura se describe que la lesión hepática inducida por antituberculosos produce cambios degenerativos en los hepatocitos, inflamación portal, necrosis, cambios grasos y degeneración balonada,<sup>12</sup> y en la hepatotoxicidad inducida por rifampicina puede observarse hemorragia focal, inflamación centrolobulillar, necrosis en puente y focal.<sup>40</sup>

En este estudio se observaron cambios estructurales como vacuolización perinuclear, congestión sinusoidal, dilatación sinusoidal, zonas de inflamación periportal y núcleos picnóticos en el grupo B. En contraste, en el grupo D se observó menor vacuolización y congestión sinusoidal, comparado con el grupo C y estructura hepática similar al grupo A

La media de los puntajes hallados en el grupo B fue mayor en el grupo B en comparación con el grupo A, C y D; y mayor en el grupo C en comparación con el grupo D. Lo que sugiere mayor daño hepático en los grupos B y C, que en el grupo D. Se halló diferencia significativa entre los score total asignados a cada grupo experimental (P. Kruskal Wallis,  $p=0,001$ )

Por su parte silimarina y su compuesto la silibina son reconocidos como antioxidantes debido a que disminuyen los radicales libres e inhiben la peroxidación lipídica y se ha demostrado que su utilización es útil en la hepatitis viral aguda y crónica; y en la hepatitis inducida por etanol. Por sus propiedades hepatoprotectoras se utilizó este fármaco como gold estándar. En este estudio la silimarina revirtió el incremento de las enzimas hepáticas inducido por la injuria hepática inducida por rifampicina, al disminuir su salida a la circulación

mediante sus propiedades estabilizadoras de membrana. Estos resultados fueron similares a los hallados por Beklur *et.al.* y Tayal *et.al.*<sup>14,41</sup>

Tanto a nivel clínico, bioquímico y morfológico los efectos producidos por la silimarina fueron comparables a los del extracto acuoso de *Peumus boldus*.

El análisis de todos estos parámetros sugiere que las hojas de *Peumus boldus* contienen fitoquímicos capaces de proteger al tejido hepática contra la injuria producida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.

Sin embargo, aunque los preparados de boldo son benéficos en mejorar la función hepática, la literatura recomienda no tomarlo sin prescripción médica, por periodos mayores a 4 semanas, ni durante el embarazo y la lactancia. Esto se debe a que no existe evidencia clara que demuestre que la ingesta de extracto de boldo no produzca enfermedades en el lactante ni abortos espontáneos. Por último, Mejía *et.al.* describe la presencia de una neurotoxina, la tetrahidroisoquinolona, que disminuye los niveles de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra de ratas Holtzman macho, produciendo neurotoxicidad.<sup>41</sup>

Por último, la prueba de Kruskal Wallis es una prueba no paramétrica de comparación de medias, lo que quiere decir que no estima la variación normal de las variables y puede ser utilizada con muestras menos de 30 sujetos. En este estudio se utilizó esta prueba debido a que el objetivo principal fue el determinar el efecto protector del extracto acuoso de *Peumus boldus* en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra, por lo que se comparó la media del grupo que recibió rifampicina con el que recibió



extracto acuoso de boldo. No se utilizaron otras pruebas estadísticas para comparar las medias entre los grupos experimentales, debido a que no fue objetivo principal de este estudio. Sin embargo, es recomendable que ello se realice en estudios posteriores

## CAPITULO V:

### 5.1 Conclusiones

- El extracto acuoso de Boldo posee un efecto protector en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra, evidenciado por criterios clínicos, bioquímicos, morfológicos e histopatológicos.
- El efecto hepatoprotector del extracto acuoso de boldo en la injuria hepática inducida por rifampicina fue comparable al producido por la silimarina.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda se realicen nuevos estudios acerca de los efectos y seguridad de la administración de extracto acuoso de Boldo en humanos.
- Se recomienda se analicen otros parámetros bioquímicos como tiempo de protrombina, INR, gamma-glutamyl transferasa y deshidrogenasa láctica.
- Se recomienda se analice el efecto protector del boldo en la toxicidad inducida por rifampicina mediante pruebas de oxidación del tejido hepático.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rao ChV, Rawat AK, Singh AP, Singh A, Verma N. Hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Ziziphus oenopia* (L.) Mill roots against antitubercular drugs induced hepatotoxicity in experimental models. *Asian Pac J Trop Med*. 2012 Apr;5(4):283-8. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60040-6.
2. Veloz D. Determinación de la actividad hepatoprotectora de Boldo ( *Peumus boldus*) en ratas ( *Rattus norvegicus*) con intoxicación hepática inducida por paracetamol.[Tesis].Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.(2013)Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2474/1/56T00342.pdf>
3. World Health Organization .Global Tuberculosis report.2014. Disponible: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1)
4. Gómez CU, Agudelo BY, Berrouet MM, Escobar TI. Toxicidad hepática por medicamentos antituberculosos. *Iatreia* .2008; 21(1):41-48.Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932008000100005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932008000100005&lng=en).
5. Enriquez CG. “Efecto protector del HGF ante el daño hepático inducido por la isoniazida y rifampicina”.[Tesis] México D.F. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salavador Zubirán”. Sección de Patología experimental del Departamento de Patología (2012) Disponible en: <file:///C:/Users/FREE/Desktop/trabajo/43%20trabajo%20de%20experimentacion.pdf>
6. Navarro VJ, Senior JR. Drug – related Hepatotoxicity. *N Engl J Med*.2006; 354:731-739. DOI: 10.1056/NEJMra052270
7. Shen C, Cheng X, Li D, Meng Q. Investigation of rifampicin-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes maintained in gel entrapment culture. *Cell Biol Toxicol*. 2009 Jun; 25(3):265-74. doi: 10.1007/s10565-008-9076-8.

8. Sude E, Fikriye U, and Fricket I. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutr Metab (Lond)*. 2008; 5: 18. doi: 10.1186/1743-7075-5-18.
9. Singh M, Sasi P, Gupta VH, Rai G, Amarapurkar DN, Wangikar PP. Protective effect of curcumin, silymarin and N-acetylcysteine on antitubercular drug-induced hepatotoxicity assessed in an in vitro model. *Hum Exp Toxicol*. 2012 Aug; 31(8):788-97. doi: 10.1177/0960327111433901.
10. Ochoa C, *et. al*. Efecto protector de *Peumus Boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. *CIMEL* 2008;13(1): 20-25. Disponible en : [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13\\_n1/pdf/a05v13n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cimel/v13_n1/pdf/a05v13n1.pdf)
11. Veloz D. Determinación de la actividad hepatoprotectora de Boldo ( *Peumus boldus*) en ratas ( *Rattus norvegicus*) con intoxicación hepática inducida por paracetamol.[Tesis]. Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.(2013) Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2474/1/56T00342.pdf>
12. Kalra BS, Aggarwal S, Khurana N, Gupta U. Effect of cimetidine on hepatotoxicity induced by isoniazid-rifampicin combination in rabbits. *Indian J Gastroenterol*. 2007 Jan-Feb;26(1):18-21. Disponible: <http://medind.nic.in/ica/t07/i1/icat07i1p18.pdf>.
13. Shih TY., Young TH, Lee HS., Hsieh CB., Hu OY. Protective effects of kaempferol on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity.. *The AAPS Journal*. 2013;15(3):753-762. doi: 10.1208/s12248-013-9490-6. <http://europemc.org/articles/PMC3691431>
14. Tayal V, Kalra BS, Agarwal S, Khurana N, Gupta U. Hepatoprotective effect of tocopherol against isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity in albino rabbits. *Indian J Exp Biol*. 2007 Dec;45(12):1031-6 Disponible en : [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5362/1/IJEB%2045\(12\)%201031-1036.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5362/1/IJEB%2045(12)%201031-1036.pdf)
15. Pandit A, Sachdeva T, & Bafna P. Ameliorative effect of leaves of carica papaya in ethanol and antitubercular drug induced hepatotoxicity *British J. Pharma Research*. 2013;3(4): 648-61. DOI : 10.9734/BJPR/2013/4517

Retrieved from  
<http://search.proquest.com/docview/1400266631?accountid=12268>

16. Jatav SK, Kulshrestha A, Zacharia A, Singh N, Tejavathi G, Bisen PS, Prasad GB. Spirulina maxima Protects Liver From Isoniazid and Rifampicin Drug Toxicity.. J Evid Based Complementary Altern Med. 2014 Apr 17;19(3):189-194.
17. Gerhardt D, Horn AP, Gaelzer MM, Frozza RL, Delgado-Cañedo A, Pelegri AL, Henriques AT, Lenz G, Salbego C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. Invest New Drugs. 2009 Dec;27(6):517-25. doi: 10.1007/s10637-008-9203-7.
18. Bakare RV, Nalawade SP. Modulation of rifampicin induced depletion of glutathione in liver of male albino rats by mandur bhasma. J. Cell Tissue Research. 2012; 12 ( 2): 3169
19. Ríos D., Sandoval D., Pineda A. ,Gómez C. Detection of boldine via HPLC in Peumus boldus Molina propagated by in vitro culture. Molecular Medicinal Chemistry. January-April 2010; 21: 113-116. Disponible en: <http://www.idecefyn.com.ar/MMC21PDF/mmcV2124FIN.pdf>
20. FDA. Guidance for Industry. Drug induced liver injury: premarketing Clinical Evaluation. 2009. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM174090.pdf>
21. FDA.CDER-PhRMA-AASLD-Conference 2000. Clinical White paper. Disponible en: <file:///C:/Users/FREE/Desktop/trabajo/81-FDA%202000.pdf>
22. Coca NS, Oliveira MS, Voietta I, Antunes CM, Lambertucci JR. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: A comparison between patients with and without human immunodeficiency virus seropositivity. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Nov-Dec;43 (6):624-8.
23. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, et.al. An official ATS statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2006 Oct 15;174(8):935-52. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/199611034?accountid=12268>.

24. Ali AH, Belachew T, Yami A, & Ayen W Y. Anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity among TB/HIV co-infected patients at jimma university hospital, ethiopia: Nested case-control study. PLoS One, 8(5) doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064622>.
25. Warmelink, I, ten Hacken NH, van der Werf TS , & van Altena, R. Weight loss during tuberculosis treatment is an important risk factor for drug-induced hepatotoxicity. Br J Nutr. 2011 Feb;105(3):400-8. doi: 10.1017/S0007114510003636
26. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, et.al. An official ATS statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2006 Oct 15;174(8):935-52. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/199611034?accountid=12268>.
27. Tejada, C. Hepatotoxicidad por Fármacos. Rev Clin Med Fam 2010, 3(3): 177-191 Oct. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4321/S1699-695X2010000300006>
28. Rana SV, Kamboj JK, Sharma SK, Ola RP, Sinha SK, & Singh K. Antioxidant status and GST gene polymorphisms in antitubercular treatment-induced hepatotoxicity patients. Hepatol Int. 2013; 7:876–882. DOI 10.1007/s12072-013-9452-1
29. Litter M. Compendio de Farmacología. Quinta edición. Editorial El Ateneo. Capítulo 49: Quimioterapia de la tuberculosis y lepra. Pág. 761 -770
30. Shen C, Cheng X, Li D, & Meng Q. Investigation of rifampicin-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes maintained in gel entrapment culture. Cell Biol Toxicol. 2009 Jun;25(3):265-74. doi: 10.1007/s10565-008-9076-8.
31. Eminzade S, Uras F, V Izzettin F. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. Nutr Metab (Lond). 2008; 5: 18. doi: 10.1186/1743-7075-5-18. Disponible en : <http://europepmc.org/articles/PMC2491620>.
32. Dalaklioglu S, Genc G, Aksoy NH , .Akçit F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. Human and experimental Toxicol. 2013;32 (6) 662-671. DOI: 10.1177/0960327112468178

33. Hassan AS, Ahmed JH, Al-Haroon SS. A study of the effect of *Nigella sativa* (Black seeds) in isoniazid (INH)-induced hepatotoxicity in rabbits. *Indian J Pharmacol.* 2012 Nov-Dec;44(6):678-82. doi: 10.4103/0253-7613.103239.
34. Rana SV<sup>1</sup>, Pal R, Vaiphe K, Singh K. Effect of different oral doses of isoniazid-rifampicin in rat. *Mol Cell Biochem.* 2006 Sep;289(1-2):39-47
35. Jaydeokar AV, Bandawane DD, Bibave KH, Patil TV. Hepatoprotective potential of *Cassia auriculata* roots on ethanol and antitubercular drug-induced hepatotoxicity in experimental models. *Pharm Biol.* 2014 Mar;52(3):344-55. doi: 10.3109/13880209.2013.837075.
36. Bektur NE, Sahin E, Baycu C, Unver G. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. *Toxicol Ind Health.* 2013 Nov 5. [Epub ahead of print]
37. Panda VS, Hardik D, Ashar, Sharan A. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Garcinia indica* fruit rind in antitubercular drug-induced liver injury in rat. *Botanics: Targets and Therapy* 2013;3 29–37
38. Nitin M., Syeda Sana, Amreen Begum, Ansari Firdous. Protective effect of Aqueous extracts of *Sacharum officinarum* leaves against Rifampicin-induced Hepatotoxicity in Rats *Research J. Pharm. and Tech.* August 2013 6(8).
39. Swamy AH, Kulkarni RV, Koti BC, Gadad PC, Thippeswamy AH, Gore A. Hepatoprotective Effect of *Cissus quadrangularis* Stem Extract Against Rifampicin-induced Hepatotoxicity in Rats. *Indian J Pharm Sci.* 2012 Mar;74(2):183-7. doi: 10.4103/0250-474X.103859.
40. Bektur NE, Sahin E, Baycu C, Unver G. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. *Toxicol Ind Health.* 2013 Nov 5. [Epub ahead of print]



41. Mejia-Dolores JW et.al. Efecto neurotóxico del extracto acuoso de boldo (*Peumus boldus*) en un modelo animal. Rev. Perú.med.exp.saludpublica. 2014; 31(1):62-68.

## ANEXOS

- Anexo N°1: Certificado sanitario de los animales de experimentación (Instituto Nacional de Salud)
- Anexo N°2: Certificado de autenticidad de las hojas de *Peumus boldus* (Museo de Historia Natural)
- Anexo N°3: Obtención del extracto acuoso de *Peumus boldus*
- Anexo N°4: Obtención de muestra sanguínea mediante punción cardíaca
- Anexo N°5: Operacionalización de variables
- Anexo N°6: Matriz de consistencia

Anexo N°1: Certificado sanitario de los animales de experimentación  
(Instituto Nacional de Salud)

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLOGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO			
CERTIFICADO SANITARIO N°		221-2014	
Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 11 - 2014
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 10
Cepa	: Holtzman	Edad	: 1 mes
Peso	: 80-120 g.	Sexo	: hembras
G.R..	: 030513	Destino	: Olivares Huamán, Jorge Luis
Lima	: 03-11-2014		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, <b>Arturo Rosales Fernández</b>. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p> <p>Chorrillos, 03 de Noviembre del 2014 (Fecha de emisión del certificado)</p> <p><b>NOTA :</b> El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p> <p> M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586</p>			

Anexo N<sup>o</sup>2:      Certificado de autenticidad de las hojas de  
*Peumus boldus* (Museo de Historia Natural)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

**CONSTANCIA N° 346-USM-2014**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas) recibida de **Elsa YOVERA LEYVA** ha sido estudiada y clasificada como: ***Peumus boldus* Molina** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: MAGNOLIIDAE**

**ORDEN: LAURALES**

**FAMILIA: MONIMIACEAE**

**GENERO: *Peumus***

**ESPECIE: *Peumus boldus* Molina**

Nombre vulgar: "boldo"  
Determinado por Blgo. Severo Baldeon.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 28 de octubre del 2014



**Dra. Haydee Montoya Terreros**

**JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)**

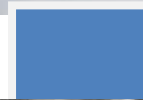
Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfonos: (511) 471-0117, 470-4471,  
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe  
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

### ANEXO N°3.

Obtención del  
extracto  
acuoso de  
*Peumus Boldus*



## ANEXO N°2. Obtención de muestra sanguínea



## ANEXO N°5 .OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Dimensión		Valores finales	Naturaleza de la variable	Escala de medición	Instrumento
<b>Criterios clínicos</b>	Peso inicial		En gramos	Cuantitativa, continua	Razón	
	Peso final		En gramos	Cuantitativa, continua	Razón	
<b>Criterios histopatológicos</b>	Microscopía	Color	Rojo vinoso Rojo pálido Moteado Moteado con áreas azul violetas	Cualitativa	Nominal	
		Aspecto	Congestivo No congestivo	Cualitativa,	Nominal	
		Tamaño	En centímetros	Cuantitativa, continua	Razón	
		Peso	En gramos	Cuantitativa, continua	Razón	
	Microscopia	Núcleos picnóticos y vacuolización perinuclear	0-3	Cuantitativa, discreta	Razón	Escala semicuantitativa

		Congestión vascular de sinusoides y dilatación sinusoidal	0-3	Cuantitativa, discreta	Razón	Escala semicuantitativa
		Número de células de Kupffer activadas	0-3	Cuantitativa, discreta	Razón	Escala semicuantitativa
<b>Criterios bioquímicos</b>	TGO		U/L	Cuantitativa, continua	Razón	
	TGP		U/L	Cuantitativa, continua	Razón	
	Bilirrubinas totales		mg/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Bilirrubina directa		mg/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Bilirrubina indirecta		mg/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Proteínas totales		g/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Albumina		g/dl	Cuantitativa, continua	Razón	
	Globulinas		g/dl	Cuantitativa, continua	Razón	



## ANEXO N°6: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Problemas	Objetivos	Hipótesis	Variables e indicadores	Justificación	Metodología
<b>Problema general:</b>  <b>¿Tendrá efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra?</b>	Objetivo general :  Determinar el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la hepatotoxicidad inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.	Hipótesis general:  El extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” posee efecto protector en la toxicidad inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.		*La tuberculosis es en la actualidad un grave problema de salud pública.  *La rifampicina es una de las principales drogas utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis, siendo la principal causa de suspensión del tratamiento, la toxicidad hepática inducida por estos medicamentos.	Tipo de estudio: experimental completo  Muestra de estudio: Se utilizaran 24 ratas Holtzman hembra  Análisis estadístico: Los resultados serán analizados en SPSS versión 19 y se presentaran sus medias y desviaciones estándar.
<b>Problema específico 1:</b>  <b>¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la alteración del parámetro clínico producida por la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra?</b>	Objetivo específico 1:  Determinar la alteración en el parámetro clínico producida por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida		VD: criterios clínicos  VI: hepatotoxicidad inducida por rifampicina	*Este estudio se registrá mediante las leyes y principios bioéticos internacionales para la Investigación con Animales establecido por el Consejo	Para la comparación de las medias entre los grupos experimentales se utilizara la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

	por rifampicina en ratas Holtzman hembra.		Internacional de Organizaciones Medicas (CIOM-OMS 1985).
<b>Problema específico 2:</b>	Objetivo específico 2: Determinar la alteración en los parámetros bioquímicos producida por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.	VD: alteración en los parámetros bioquímicos	* Existen muy pocos estudios acerca de las propiedades antioxidantes del Boldo y sus posibles efectos benéficos y hepatoprotectores
<b>¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en la alteración de los parámetros bioquímicos producidos por la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra?</b>		VI: hepatotoxicidad inducida por rifampicina.	* Este estudio servirá para aportar nueva evidencia científica acerca de los efectos del extracto acuoso de Boldo sobre la toxicidad hepática inducida por rifampicina
<b>Problema específico 3:</b>	Objetivo específico 3: Determinar los cambios macroscópicos en la morfología hepática	VD: cambios macroscópicos en la morfología hepática	
<b>¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> "Boldo" en los</b>			

<b>cambios macroscópicos producidos por la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra , según criterios anatomopatológicos en la macroscopía de tejido hepático?</b>	producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.	VI: hepatotoxicidad inducida por rifampicina
<b>Problema específico 4:</b>  <b>¿Tiene efecto protector el extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en los cambios histopatológicos producidos por la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra?</b>	<b>Objetivo específico 4:</b> Determinar los cambios histopatológicos producidos por el efecto protector del extracto acuoso de las hojas de <i>Peumus boldus</i> “Boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas Holtzman hembra.	VD: cambios histopatológico de hepatotoxicidad .  Vi: hepatotoxicidad inducida por rifampicina

